

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Željka Peršurić

**Analiza autentičnosti maslinova ulja uz pomoć
visokoprotočnih instrumentalnih metoda
temeljenih na masenoj spektrometriji**

DOKTORSKI RAD

Mentor: izv. prof. dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić

Rijeka, 2018.

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Željka Peršurić

**Analysis of the authenticity of olive oil by using
high-throughput mass spectrometry methods**

DOCTORAL THESIS

Mentor: PhD Sandra Kraljević Pavelić

Rijeka, 2018.

Mentor rada: izv. prof dr. sc. Sandra Kraljević Pavelić

Doktorski rad je obranjen dana ____23.7.2018.____ na Sveučilištu u Rijeci, Odjel za biotehnologiju, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Izv.prof. dr.sc. Mirela Sedić
2. Izv.prof. dr.sc. Marta Žuvić
3. Doc. dr.sc. Mladenka Šarolić
4. Izv.prof. dr.sc. Sandra Kraljević Pavelić

Hvala

Mojoj mentorici prof. dr. sc. Sandri Kraljević Pavelić na svim savjetima i sveukupnoj pomoći prilikom istraživanja i izrade ovog doktorskog rada.

Lari Saftić na nesebičnoj pomoći bez koje ovog rada ne bi bilo.

Mojoj obitelji i dečku na pomoći i podršci.

Nacionalno financiranje - Sveučilišna potpora znanstvenim istraživanjima Sveučilišta u Rijeci dodijeljena izv. prof. dr. sc. Sandri Kraljević Pavelić

Projekt HRZZ „Visokoprotlačne analitičke platforme za kontrolu kvalitete i provjeru izvornosti hrane iz jadranskog područja“

Pristup dijelu opreme korištene za izradu ovog doktorskog rada omogućen je projektom Sveučilišta u Rijeci „Razvoj istraživačke infrastrukture na kampusu sveučilišta u Rijeci“ koji je financiran iz Europskog fonda za regionalni razvoj (EFRR) u iznosu od 180.182.048,91 kn te donacijom Metrohm A.G., Switzerland.

Sažetak

Autentičnost maslinovog ulja kompleksna je problematika koja zahtjeva nova analitička rješenja. U ovoj je disertaciji provedena karakterizacija hrvatskih maslinovih ulja te se ispitaio utjecaj zemljopisnog podrijetla na njihov sastav. U tu je svrhu razvijena analiza lipidnih sastavnica s izuzetno osjetljivim i brzim, tzv. visokoprotočnim instrumentalnim metodama temeljenim na masenoj spektrometriji. Profili triacilglicerola (TAG) su prikupljeni uz pomoć matricom potpomognute ionizacije laserskom desorpcijom-masene spektrometrije (MALDI-MS), dok je potpuna strukturna karakterizacija TAG postignuta tandemskom MS analizom. Sastav masnih kiselina određen je plinskom kromatografijom spregnutom s masenom spektrometrijom (GC-MS). Također je provedena neselektivna analiza maslinovih ulja uz pomoć bliske infracrvene spektroskopije (NIRS). Sinergija razvijenih analitičkih i kemometrijskih metoda testirala se s ciljem razvoja najboljeg protokola za brzo i točno određivanje zemljopisnog podrijetla analiziranih maslinovih ulja. Kemometrijske metode su pokazale kako TAG i NIR spektri imaju najveći potencijal za korištenje u predikciji zemljopisnog podrijetla. Naime, metoda glavnih komponenti (PCA) je pokazala kako TAG profil najbolje grupira ekstra djevičanska maslinova ulja prema zemljopisnoj pripadnosti, dok su se metodom parcijalnog najmanjeg kvadrata - diskriminantom analizom (PLS-DA) najbolji modeli za zemljopisnu klasifikaciju postigli s TAG profilom i važnim NIR varijablama. Osim toga, TAG profil bio je koristan u otkrivanju krivotvorenja ekstra djevičanskog maslinovog ulja dodatkom rafiniranih ulja ili maslinovih ulja niže kategorije kvalitete, dok je NIRS bila korisna u brzom i efikasnom provjeri kategorije ulja prije zemljopisne klasifikacije. Provedenim istraživanjem potvrđena je važnost visokoprotočnih metoda MALDI-MS i GC-MS u potpunoj karakterizaciji maslinovih ulja, te je prepoznata vrijednost brzih i povoljnih NIRS metoda za provjeru autentičnosti maslinovih ulja.

Ključne riječi

Maslinovo ulje, MALDI-TOF/MS, GC-MS, NIRS, zemljopisno podrijetlo, kemometrija

Summary

Olive oil authenticity is a complex issue seeking new analytical solutions. In order to characterize Croatian olive oil and to better understand the influence of geographical origin on its composition, fast and sensitive high-throughput mass spectrometry methods were developed. Triacylglycerol (TAG) profiles were collected by matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry (MALDI-MS), whereas complete structural characterization of TAG was achieved by MS/MS analysis. Fatty acid (FA) composition was determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). At the same time, non-selective analysis of olive oils was performed by near-infrared spectroscopy (NIRS). The synergy of the developed analytical methods combined with chemometrics was tested in order to determine the best protocol for olive oil geographical origin classification. Chemometric methods showed that TAG and NIR spectra have the highest potential for prediction of geographical origin. Namely, TAG profile had the best grouping power for extra virgin olive oils in the principal component analysis (PCA), whereas partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) models with the highest classification accuracy were based on TAG data and NIRS significant variables. Furthermore, TAG profiling data were indicative for extra virgin olive oil adulteration with refined oils or lower-grade olive oils, while NIRS data proved to be valuable in prediction of olive oil quality parameters prior to further determination of geographical origin. The present study has confirmed the importance of high-throughput MALDI-MS and GC-MS methods for complete characterization of olive oils, but also the value of NIRS as a quick and reliable technique for testing the authenticity of olive oils.

Keywords

Olive oil, MALDI-TOF/MS, GC-MS, NIRS, geographical origin, chemometrics

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Maslina i maslinovo ulje.....	2
1.1.1. Kategorije maslinovog ulja	3
1.2. Kemijski sastav djevičanskog maslinovog ulja.....	4
1.2.1. Gliceridni dio	4
1.2.1.1. Masne kiseline	4
1.2.1.2. Triacilgliceroli.....	6
1.2.2. Negliceridni dio	7
1.3. Utjecaj maslinovog ulja na zdravlje.....	8
1.4. Karakteristike maslinarsko-uljarske djelatnosti u Istarskoj županiji i ostalim hrvatskim maslinarskim regijama	12
1.5. Oznaka izvornosti i zemljopisnog podrijetla maslina i maslinovog ulja	13
1.6. Utvrđivanje autentičnosti maslinovih ulja	14
1.6.1. Standardne rutinske metode za dokazivanje kvalitete i autentičnosti maslinovog ulja	16
1.6.2. Novi pristupi i analitičke metode u određivanju autentičnosti ulja	17
1.7. Instrumentalne metode za analizu lipida	20
1.7.1. MALDI-TOF/MS i njegova primjena u analizi lipida	22
1.7.1.1. Princip rada MALDI-TOF/MS	22
1.7.1.2. MALDI-TOF/MS u analizi lipida	22
1.8. Metode analize glavnih komponenta maslinovog ulja u svrhu karakterizacije i dokazivanja autentičnosti	25
1.8.1. Analiza triacilglicerola u biljnim uljima s posebnim naglaskom na maslinovo ulje... ..	25
1.8.2. Analiza masnih kiselina u biljnim uljima s posebnim naglaskom na maslinovo ulje. ..	27
1.9. NIR spektroskopija i njezina primjena u analizi maslinovog ulja.....	28
1.9.1. NIR spektroskopija.....	28
1.9.2. NIR spektroskopija (NIRS) u analizi biljnih ulja s naglaskom na maslinovo ulje	29
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	31
3. MATERIJALI I METODE.....	33
3.1. Materijali	33
3.1.1. Uzorci.....	33
3.1.2. Reagensi	35

3.2.	Metode.....	35
3.2.1.	Određivanje osnovnih parametara kvalitete ulja.....	35
3.2.1.1.	Slobodne masne kiseline	35
3.2.1.2.	Peroksidni broj.....	36
3.2.1.3.	Spektrofotometrijska analiza u ultraljubičastom području.....	38
3.2.2.	MALDI-TOF/MS analiza triacilglicerola.....	39
3.2.2.1.	MALDI-TOF/TOF MS strukturna analiza triacilglicerola.....	40
3.2.3.	GC-MS analiza masnih kiselina	41
3.2.4.	NIRS	42
3.3.	Statistička analiza	43
3.3.1.	ANOVA.....	43
3.3.2.	PCA	43
3.3.3.	PLS	44
3.3.4.	PLS-DA	44
4.	REZULTATI	46
4.1.	Analiza triacilglicerola u uljima.....	46
4.1.1.	Potpuna strukturna karakterizacija triacilglicerola	48
4.2.	Analiza masnih kiselina u uljima.....	54
4.3.	Analiza hrvatskih maslinovih ulja	55
4.3.1.	Osnovni parametri kvalitete i sastav glavnih komponenta hrvatskih maslinovih ulja iz 2014. godine	55
4.3.2.	Osnovni parametri kvalitete i sastav glavnih komponenti hrvatskih maslinovih ulja iz 2015. godine.....	58
4.3.3.	NIR spektri hrvatskih maslinovih ulja	61
4.4.	Mogućnosti uporabe analitičkih metoda u kombinaciji s kemometrijom u otkrivanju autentičnosti maslinovih ulja	62
4.4.1.	Analiza uzoraka iz 2014. godine metodom PCA.....	62
4.4.2.	Analiza uzoraka iz 2015. godine metodom PCA.....	66
4.4.3.	Određivanje zemljopisnog podrijetla ekstra djevičanskih maslinovih ulja metodom PLS-DA.....	70
4.4.3.1.	Primjenjivost modela na različite godine proizvodnje i šire zemljopisno područje.....	73
4.4.4.	Mogućnosti MALDI-TOF u određivanju krivotvorenja	77

4.5.	Određivanje osnovnih parametara kvalitete te sadržaja glavnih komponenti ulja pomoću NIR spektroskopije	86
5.	RASPRAVA	92
5.1.	Analize triacilglicerola na MALDI-TOF/MS i MALDI-SpiralTOF/MS	92
5.2.	Potpuna strukturna karakterizacija triacilglicerola na MALDI-SpiralTOF/TOF	94
5.3.	Analiza masnih kiselina na GC-MS-u	96
5.4.	Analitički parametri hrvatskih maslinovih ulja iz 2014. godine.....	97
5.5.	Analitički parametri hrvatskih maslinovih ulja iz 2015. godine.....	98
5.6.	NIRS analiza maslinovih ulja	99
5.7.	Mogućnosti analitičkih metoda u kombinaciji s kemometrijom u otkrivanju autentičnosti maslinovih ulja	100
5.7.1.	Analize uzoraka iz 2014. godine metodom PCA.....	100
5.7.2.	Analize uzoraka iz 2015. godine metodom PCA.....	102
5.7.3.	Analiza PLS-DA.....	103
5.7.3.1.	Testiranje PLS-DA modela vanjskim validacijskim setovima	105
5.7.4.	Baza rezultata molekularnih profila hrvatskih maslinovih ulja	107
5.8.	Mogućnosti MALDI-TOF analize u određivanju krivotvorenja	108
5.9.	Određivanje sadržaja glavnih komponenti ulja i osnovnih parametara kvalitete pomoću NIR spektroskopije	111
6.	ZAKLJUČCI.....	114
7.	LITERATURA.....	116
8.	POPIS KRATICA	131
9.	POPIS ILUSTRACIJA	133
10.	ŽIVOTOPIS.....	140

1. UVOD

Maslinovo ulje ima dugu tradiciju kao sastavni dio mediteranske prehrane, a danas se njegova konzumacija proširila diljem svijeta. No, nisu sva maslinova ulja ista, samo djevičanska maslinova ulja obiluju komponentama s pozitivnim učinkom na zdravlje (Bajoub i sur., 2018). Također, dodatnu vrijednost djevičanska ulja imaju s obzirom na zemljopisno područje uzgoja. Naime, utjecaj okoliša, poput lokalne klime i sastav tla te sam način ekstrakcije ulja pridonose stvaranju specifičnih karakteristika maslinovih ulja pojedinog područja koja u pravilu određuju specifičnosti i kvalitetu odnosno cijenu završnog proizvoda na tržištu što se ponekad i negativno iskorištava. U želji za većom zaradom nepošteni trgovci krivo označavaju maslinova ulja ili u visokokvalitetna ulja dodaju ulja niže kvalitete. Zakonodavstvo naravno pokušava zaustaviti ovakvu nepoštenu praksu (Perri i sur., 2012). Europska Unija (EU) jasno definira tržišne standarde za maslinova ulja uključujući segment označavanja podrijetla djevičanskih i ekstra djevičanskih ulja kako bi zaštitila svoje potrošače (European Commission, 2012). Hrvatski proizvođači maslinovog ulja također moraju poštivati definirane standarde. U jadranskim regijama Hrvatske, proizvodnja maslinovog ulja ima veliku ekonomsku i gospodarsku važnost. Istra je primjerice, jedna od hrvatskih regija s dugogodišnjom tradicijom proizvodnje maslinovog ulja koje postaje sve više prepoznatljivo po svom karakterističnom sastavu (Poljuha i sur., 2008). Nažalost, ni hrvatska ulja nisu pošteđena nepoštenih trgovačkih praksi koje najviše štete nanosi upravo proizvođačima visokokvalitetnih i autentičnih proizvoda. Uzimajući u obzir porast proizvodnje maslinovog ulja u Hrvatskoj, ali i u EU, ova problematika postaje sve bitnija kako za potrošače tako i za proizvođače. Zadnje desetljeće razvijene su mnogobrojne analitičke tehnike kojima se omogućava praćenje kvalitete odnosno u konačnici sljedivosti maslinovog ulja. Pomoću tih tehnika prate se različite komponente maslinovog ulja kao potencijalni određujući faktori. No, to nije uvijek jednostavno uzimajući u obzir da je sastav maslinovog ulja rezultat kompleksne interakcije između sorte maslina, okolišnih uvjeta, zrelosti ploda i tehnike ekstrakcije ulja (Araghipour i sur., 2008; Perri i sur., 2012). Maslinova ulja s istih područja mogu imati različite komponente dok se iste komponente mogu pronaći kod ulja koja dolaze sa najudaljenijih područja. Odabir određujuće sastavnice maslinovog ulja bila ona glavna komponenta ili neka manje zastupljena, kao i analitičke

tehnike stoga su bitan element svake analize autentičnosti maslinovog ulja. Standardne metode za analizu kvalitete i autentičnosti maslinovog ulja propisane od strane zakonodavnih tijela danas su neizostavne u kontroli maslinovog ulja. Iako se koriste u svakodnevnoj praksi, još uvijek nisu adekvatne za rješavanje mnogih nerješivih problema (Bajoub i sur., 2018). Naime, to su metode koje iziskuju mnogo vremena, troše velike količine otapala čime se generira i velika količina otpada, a sama točnost metode ovisi o stručnosti analitičara (Bajoub i sur., 2018; Dais i Hatzakis, 2013). Te metode imaju i mnoga druga ograničenja tijekom analize krivotvorenja ulja poput neučinkovitosti detekcije ukoliko su krivotvorenja u niskim količinama, ali i nemogućnosti otkrivanja izvora krivotvorenja. Nadalje, po pitanju zemljopisne i sortne karakterizacije ulja, standardne metode ne daju potpune odgovore. Naime, nedostatak standardiziranih procedura i kvalitetnih baza podataka trenutno onemogućava brze i jednostavne provjere maslinovih ulja s deklariranim zemljopisnim podrijetlom ili deklariranom sortom maslina. Dakako, napredak analitičke tehnologije omogućio je povećanje osjetljivosti, brzine i točnosti detektiranja analita u smjesi. Posebice je napredak vidljiv u metodama masene spektrometrije, tehnologiji koja pokazuje iznimne rezultate, a njezine mogućnosti u istraživanju autentičnosti ulja još uvijek nisu do kraja ispitane. Također, brze i nedestruktivne spektroskopske metode sve su zanimljivije istraživačima i proizvođačima (Bajoub i sur., 2018). Valja međutim napomenuti kako sve ove tehnologije generiraju veliku količinu podataka stoga pravilna obrada podataka predstavlja neizostavan element svake analize autentičnosti maslinovog ulja.

1.1. Maslina i maslinovo ulje

Maslina i maslinovo ulje nisu samo važan gospodarski čimbenik već i dio tradicije brojnih zemalja. Važnost masline kroz povijest očitava se i kroz njezino simboličko značenje u grčkoj mitologiji sve do simbola mira u kršćanstvu (Škarica i sur., 1996). O maslinovom ulju pisao je još Homer nazivajući ga „tekućim zlatom“, dok se Hipokrat bavio pitanjima terapijske vrijednosti maslinova ulja. Maslina je jedno od najstarijih kultiviranih stabala na svijetu čiji se počeci bilježe u području Mezopotamije, Sirije i Palestine, odakle se maslina proširila Mediteranom uključujući i Hrvatsku (Kantoci, 2006). Danas maslinu osim u mediteranskim zemljama možemo pronaći i u

ostalim područjima svijeta gdje je mediteranski tip klime sa suhim vrućim ljetom i blagim zimama (Gugić i Šarolić, 2017). U Hrvatskoj je maslina rasprostranjena duž cijelog priobalja i pripadajućih otoka, od Istre do najjužnijih dijelova Dalmacije. Koliko je maslina dugo dio povijesti hrvatskih prostora govori i činjenica da su jedne od najstarijih maslina na Sredozemlju pronađene na Brijunima i u Kaštel Štafiliću (Kantoci, 2006). U Hrvatskoj postoji nekoliko autohtonih sorti maslina. Za područje Dalmacije od velike je važnosti *Oblica*, dok su za istarske maslinike karakteristične među ostalim *Buža* i *Istarska bjelica*. Uz njih, postoje još mnoge autohtone sorte koje uz novouvedene sorte pridonose raznolikosti i bogatstvu hrvatskog maslinovog ulja (Škarica i sur., 1996). Posebnost hrvatskih maslinovih ulja leži i u klimatskim uvjetima te svojstvima tla svakog pojedinog područja koji osiguravaju proizvodnju ulja visoke kakvoće. Ekstra djevičansko maslinovo ulje je najcjenjenija kategorija maslinovog ulje koja se dobiva od zdravog i neoštećenog ploda isključivo mehaničkim postupcima te obiluje komponentama koje mu osiguravaju visoku nutritivnu i zdravstvenu vrijednost (Žanetić i Gugić, 2006). Već su Rimljani u 1. stoljeću prije Krista znali da na kvalitetu maslinovog ulja utječe kvaliteta sirovine i način prerade (Gugić i Šarolić, 2017). Osim u prehrani, danas je maslinovo ulje sastavni dio mnogih kozmetičkih i medicinskih proizvoda (Rabasco Alvarez i sur., 2000). Maslinovo ulje ima izražena senzorska svojstva koja ga izdvajaju od ostalih biljnih ulja. Karakterističnog je mirisa na svježi plod masline uz primjese voćnih nota, u okusu prevladavaju gorčina i pikantnost, a prepoznatljiva boja mu je maslinastozelena. Također, jedno je od rijetkih biljnih ulja koje se proizvodi isključivo mehaničkim postupcima nakon čega je spremno za ljudsku konzumaciju (Škarica i sur., 1996).

1.1.1. Kategorije maslinovog ulja

Kategorije maslinovog ulja su definirane u uredbama EU i nacionalnim propisima (NN 7/2009, Uredba Komisije (EEZ) br. 2568/91) gdje je za svaku kategoriju maslinovog ulja definirano koja fizikalno-kemijska i senzorska svojstva mora ulje zadovoljavati da bi pripadao toj kategoriji.

Ekstra djevičansko maslinovo ulje (EDMU) je ulje dobiveno iz ploda masline isključivo mehaničkim postupcima, a sadrži najviše 0,8 grama slobodnih masnih kiselina. Djevičansko maslinovo ulje

(DMU) je isto dobiveno isključivo iz ploda masline mehaničkim postupcima, ali može sadržavati najviše 2 grama slobodnih masnih kiselina izraženo kao oleinska kiselina na 100 grama ulja. Maslinovo ulje lampante (MUL) je djevičansko maslinovo ulje, ali neprihvatljivih senzorskih svojstava, a sadrži više od 2 grama slobodnih masnih kiselina izraženo kao oleinska kiselina na 100 grama ulja. Maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja je ulje koje se dobiva miješanjem rafiniranog maslinovog ulja i djevičanskih maslinovih ulja osim maslinovog ulja lampante, a ne sadrži više od 1 gram slobodnih masnih kiselina izraženo kao oleinska kiselina na 100 grama ulja. Sve navedene kategorije ulja moraju zadovoljavati i ostala propisana fizikalno-kemijska i senzorskih svojstva čije su granične vrijednosti zadane u uredbama i pravilnicima.

1.2. Kemijski sastav djevičanskog maslinovog ulja

1.2.1. Gliceridni dio

Gliceridni dio čini najveći dio maslinovog ulja, a sastoji se od triacilglicerola (TAG), slobodnih masnih kiselina i fosfolipida. Masne kiseline (MK) čine TAG, a u znatno manjim količinama kao slobodne masne kiseline ili u sastavu monoacilglicerola i diacilglicerola. Od fosfolipida najzastupljeniji su fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilinozitol i fosfatidilserin. Od masnih kiselina u sastavu navedenih fosfolipida prevladava oleinska masna kiselina (Kiritsakis, 1990).

1.2.1.1. Masne kiseline

Osnovna sastavnica TAG maslinovog ulja su masne kiseline. Masne kiseline su slabe organske kiseline koje se sastoje od lanca ugljikovodika sa svojstvenom karboksilnom skupinom (Škarica i sur., 1996). U tablici 1 navedeni su sistemski i trivijalni nazivi masnih kiselina koje se najčešće nalaze u biljnim uljima s naznačenim brojem ugljika i dvostrukih veza te kraticom koja se koristi

za njihovo označavanje (Christie i Han, 2010). Maslinovo ulje ima masne kiseline s 12 do 24 ugljikovih atoma, a one mogu biti zasićene ili različitog stupnja nezasićenosti (Škarica i sur., 1996). Jednostruko nezasićena oleinska kiselina (18:1 n-9) je najzastupljenija masna kiselina u maslinovom ulju. Sastoji se od 18 ugljikovih atoma i jedne dvostruke veze, a pripada omega-9 masnim kiselinama. U maslinovom ulju ona čini čak 55 % do 83 % svih masnih kiselina. Uz oleinsku kiselinu maslinovo ulje sadrži i ostale jednostruko nezasićene kiseline poput palmitoleinske kiseline (16:1 n-7) i gadoleinske kiseline (20:1 n-11). Od višestruko nezasićenih masnih kiselina najprisutnije su linolna (18:2 n-6) i linolenska kiselina (18:3 n-3) koje kao esencijalne masne kiseline daju dodatnu biološku vrijednost maslinovom ulju. Također, u sastavu maslinovog ulja nalaze se i zasićene masne kiseline laurinska C12:0, miristinska C14:0, palmitinska C16:0, stearinska C18:0, arahinska C20:0, behenska C22:0 i lignocerinska C24:0 (Žanetić i Gugić, 2006). Sastav masnih kiselina u maslinovom ulju prikazan je u tablici 1. Ukratko, maslinovo ulje se odlikuje visokim sadržajem oleinske kiseline, optimalnom količinom višestruko nezasićenih kiselina, a umjerenim udjelom zasićenih masnih kiselina (Škarica i sur., 1996).

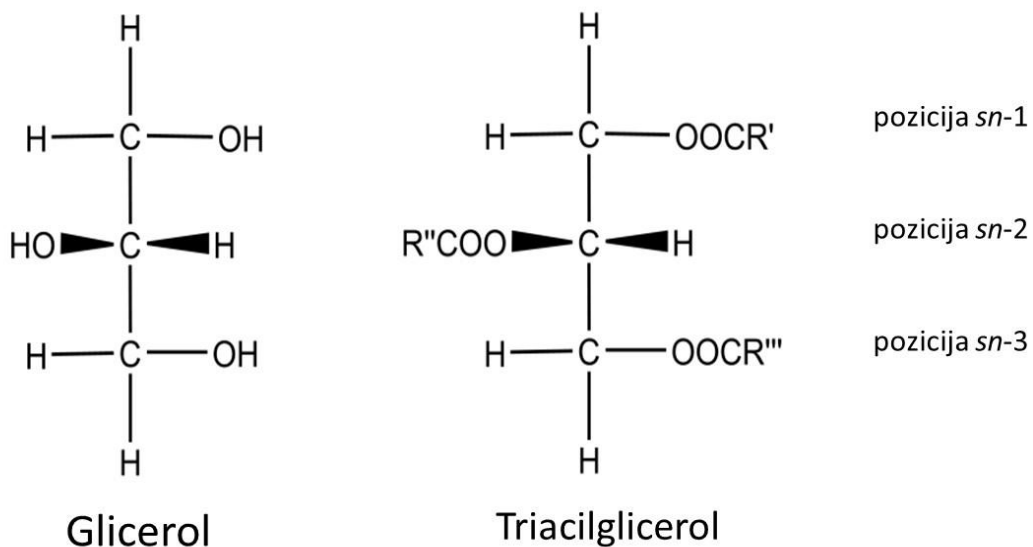
Tablica 1. Sistemski i trivijalni nazivi masnih kiselina, njihove kratice s naznačenim brojem ugljika koji čine masne kiseline te brojem dvostrukih veza (Christie i Han, 2010).

Sistemski naziv	Trivijalni naziv	Kratice	Broj ugljika: broj dvostrukih veza
tetradekadska kiselina	miristinska kiselina	M	C14:0
<i>cis</i> -9-heksadekanska kiselina	palmitoleinska kiselina	Po	C16:1
heksadekanska kiselina	palmitinska kiselina	P	C16:0
heptadekanska kiselina	margarinska kiselina	Ma	C17:0
<i>cis</i> -9-12-15-oktadekatrienska kiselina	linolenska kiselina	Ln	C18:3
<i>cis</i> -9-12-oktadekadienska	linolna kiselina	L	C18:2
<i>cis</i> -9-oktadekanska kiselina	oleinska kiselina	O	C18:1
oktadekanska kiselina	stearinska kiselina	S	C18:0

<i>cis</i> -11-eikosanoidna kiselina	gadoleinska	G	C20:1
eikosanoidna kiselina	arahidonska kiselina	A	C20:0
dokosanoidna kiselina	behenska kiselina	C	C22:0
tetrakosanoidna kiselina	lignocerinska kiselina	Li	C24:0

1.2.1.2. Triacilgliceroli

Triacilgliceroli se razlikuju po ukupnom broju ugljika (CN, od engl. *carbon number*) što je povezano sa dužinom masnih kiselina koje čine triacilglicerol. Zatim po broju dvostrukih veza (DB, od engl. *dubole bonds*), tj. njihovoj konfiguraciji i poziciji unutar masno kiselinskog ostatka, ali i po stereokemijskom razmještaju masnih kiselina na gliceridnoj okosnici (Beccaria i sur., 2016). Standardno imenovanje TAG temelji se na početnom slovu trivijalnih imena masnih kiselina prema njihovom redoslijedu na gliceridnoj okosnici. Sterokemijski TAG se opisuju pomoću stereospecifičnog nabiranja (*sn*). Fischerova projekcija glicerola i triacilglicerola je prikazana na slici 1 s naznačenim *sn*- pozicijama.



Slika 1. Fischerova projekcija glicerola i triacilglicerola s naznačenim pozicijama masnih kiselina (Indelicato i sur., 2017).

Raspored masnih kiselina unutar gliceridne okosnice nije slučajan već je povezan sa specifičnim biosintetskim putem zbog čega se gliceridna struktura može povezati s određenim uljem. Zasićene masne kiseline su većinom pozicionirane na prvim pozicijama (*sn*-1 ili *sn*-3), dok je srednja pozicija *sn*-2 često rezervirana za nezasićene masne kiseline. Uz to, manje uobičajene MK imaju tendenciju biti na *sn*-3 poziciji pošto se ta pozicija zadnja esterificira (Indelicato i sur., 2017).

1.2.2. Negliceridni dio

Negliceridni ili neosapunjivi dio maslinovog ulja čine spojevi koji pripadaju sekundarnim metabolitima biljke masline koji su neophodni za mnogobrojne fiziološke i biokemijske procese. Neki od sekundarnih metabolita prisutnih u maslinovom ulju imaju biološki učinak, a drugi utječu na senzorska svojstva maslinovog ulja poput okusa i mirisa. Od bioloških učinaka koje posjeduju posebno se ističe antioksidacijski učinak koji je važan za očuvanje samog ulja, ali je od velike važnosti i za zdravlje ljudi (Žanetić i Gugić, 2006). Maslinovo ulje je primarno prepoznato zbog svog visokog sadržaja fenolnih komponenti. Fenolne komponente ili spojevi su sekundarni biljni metaboliti prisutni u plodu masline koji tijekom prerade prelaze u ulje. Dijelev se u nekoliko skupina, a u maslinovom ulju se prvenstveno prisutne fenolne kiseline, fenolni alkoholi, flavonoidi, lignani i sekoiridoidi. Sekoiridoidi se nalaze samo u biljkama iz porodice *Oleacea* u koju spada i maslina. U maslinovom ulju fenolnih komponenta ima od 40 do 900 mg/L ovisno o sorti masline, području uzgoja, zrelosti i kvaliteti ploda, načinu prerade i svježini ulja. Dominiraju derivati oleuropein aglikona koji čini čak i do 95 % svih fenolnih komponenta. Nakon njih su zastupljeni derivati ligstrozid aglikona, ali u znatno manjim udjelima. Fenolne komponente hidrofilnog karaktera djeluju kao inaktivatori slobodnih radikala, a najveću efikasnost pokazuju upravo derivati oleuropein aglikona i hidroksitirozol (Koprivnjak, 2006). Uz fenolne komponente u negliceridnom dijelu maslinovog ulja nalaze se skvalen, steroli, terpenški alkoholi, tokoferoli,

pigmenti i tvari arome (Kiritsakis, 1990). Tokoferoli su zajedno s tokotrienolima obuhvaćeni pod imenom vitamin E. Iznimno su važni za ulje jer čuvaju nezasićene masne kiseline od oksidacijskog kvarenja. Strukturno se sastoje od dva prstena od kojih je jedan fenolni, a drugi heterociklički i izoprenskog bočnog lanaca koji je kod tokoferola zasićen, a kod tokotrienola nezasićen (Kamal-Eldin i sur., 2005). Tokoferoli se odlikuju najraznovrsnijim antioksidacijskim djelovanjem, čak su pokazali i sinergističko djelovanje s fosfolipidima i fenolima. U maslinovim uljima njihov se sadržaj kreće od 50 do 300 mg/kg, a pod snažnim je utjecajem sorte (Koprivnjak, 2006). Od oblika najzastupljeniji je α -tokoferol koji je i biološki najaktivniji. Uz njega u maslinovom ulju se nalaze i β , γ i δ oblik. U čuvanju maslinovog ulja od kvarenja sudjeluju i fitosteroli (Žanetić i Gugić, 2006). Biljni steroli ili fitosteroli su po kemijskom sastavu visokomolekularni ciklički alkoholi koji sadrže fenantrenske skupine (Belitz and Grosch, 1999). Maslinovo ulje u svom sastavu ima različite fitosterole od kojih dominiraju β -sitosterol, Δ^5 -avenasterol i kampesterol (Kammoun i Zarrouk, 2012). Biokemijski prekursor sterola je skvalen. Skvalen je triterpenski ugljikovodik s trideset ugljikovih atoma u lancu i šest dvostrukih veza (Kamal-Eldin i sur., 2005). Od svih biljnih ulja, upravo u maslinovom ulju se nalazi u većim količinama i to u koncentracijama čak do 700 mg/kg (Newmarkt, 1999). Pigmenti koji daju karakterističnu boju maslinovom ulju su klorofil i karotenoidi. Klorofil je zeleni pigment, a maslinovo ulje sadrži sivozeleni klorofil *a* i žutozeleni klorofil *b*, te smeđi feofitin *a* i feofitin *b*. Svježije maslinovo ulje ima više klorofila koji se stajanjem razgrađuje u feofitin zbog čega primarno zelena boja prelazi u žuto-smeđu boju. I ove komponente imaju antioksidacijsko djelovanje, ali samo u tami. U prisutnosti svjetla one postaju prooksidansi. Karotenoidi su tetraterpenski ugljikovodici od koji se u maslinovom ulju nalaze β -karoten, likopen i oksidirani derivat karotena ksantofil (Žanetić i Gugić, 2006).

1.3. Utjecaj maslinovog ulja na zdravlje

Zahvaljujući znanstvenim istraživanjima i spoznajama o vrijednostima maslinovog ulja danas je maslinovo ulje sinonim zdrave namirnice i sastavni dio zdravog načina življenja. Kod potrošača posebnu vrijednost ima ekstra djevičansko maslinovo ulje prepoznato zbog svoje visoke kakvoće. Redovita konzumacija maslinovog ulja se povezuje s dužim životnim vijekom posebno zahvaljujući

njegovoj ulozi u zaštiti od kardiovaskularnih bolesti. Maslinovo ulje smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti i kroz prevenciju rizičnih faktora kao što su debljina, metabolički sindrom i dijabetes tipa II. Nadalje, maslinovo ulje je pokazalo i zaštitni učinak od nekih vrsta karcinoma poput raka dojke i probavnog trakta (Buckland i Gonzalez, 2015). To je namirnica koja zaslužuje svoje mjesto u prehrani od najranije pa sve do najstarije dobi. Smatra se da ima pozitivni utjecaj na rast i razvoj djeteta zbog sličnog omjera esencijalnih masnih kiselina kao i majčino mlijeko te visokog sadržaja oleinske kiseline što povoljno utječe na rast i mineralizaciju kosti (Žanetić i Gugić, 2006). Visoki unos oleinske kiseline kroz maslinovo ulje povezuje se sa smanjenjem razine kolesterola, manjim rizikom od aterogeneze, prevencijom raznih karcinoma pa sve do poboljšanja imunog odgovora (Sales-Campos i sur., 2013). Jedan od mehanizma djelovanja oleinske kiseline je primjerice promjena ekspresije određenih onkogenih (Her-2/neu) povezanih s agresivnim tumorom kod raka dojke (Menendez i sur., 2005). No, značaj visokog sadržaja oleinske kiseline za pozitivan učinak maslinovog ulja još uvijek nije usuglašen u znanstvenoj zajednici. Dio znanstvene zajednice smatra da oleinska kiselina nije odgovorna za blagotvorno djelovanje maslinovog ulja na zdravlje zbog činjenice da se radi o neesencijalnoj masnoj kiselini te da prehrana koja ne uključuje maslinovo ulje može imati značajne količine oleinske kiseline zahvaljujući ostalim izvorima (Bernardini i Visioli, 2017). Međutim, kod populacijskih studija samo se unos oleinske kiseline kroz maslinovo ulje mogao povezati sa smanjenim rizikom od kardiovaskularnog oboljenja te povezane smrtnosti, ali i opće smrtnosti (Schwingshackl i Hoffmann, 2014).

Velika pozornost u istraživačkim krugovima pridaje se i biološki aktivnim fenolima komponentama maslinovog ulja koje pokazuju pozitivan učinak na određene fiziološke parametre. Stoga se fenolne komponente povezuju sa zaštitnim učinkom od pojave kroničnih degenerativnih bolesti, prvenstveno kardiovaskularnih bolesti (Cicerale i sur., 2010). Istraživanja na zdravim pojedincima su pokazala da unos fenolima bogatog maslinovog ulja utječe na porast cirkulirajućeg lipoproteina visoke gustoće (HDL) uz povoljniji omjer HDL-a prema ukupnom kolesterolu. Uz to, zamijećen je i zaštitni učinak fenolnih komponenta od oksidacije lipoproteina niske gustoće (LDL) (Cicerale i sur., 2010; Covas i sur., 2006; Marrugat i sur., 2004). Naime, fenolne komponente maslinovog ulja pokazuju antioksidacijsku aktivnost čime štite tijelo od razornog

djelovanja slobodnih radikala. Fenoli maslinovog ulja djeluju kao inaktivatori slobodnih radikala u uvjetima oksidacijskog stresa. Upravo se za jedan od najzastupljenijih fenola u maslinovom ulju 3,4-DHPEA-EDA pokazalo kako ima važnu ulogu u zaštiti od oksidativnih oštećenja stanica čovjeka nastalih djelovanjem reaktivnih kisikovih vrsta (Paiva-Martins i sur., 2009). Fenolne komponente maslinovog ulja imaju i protuupalni učinak s obzirom da smanjuju koncentracije upalnih markera povezanih s većim kardiovaskularnim rizikom kao što su to primjerice C-reaktivni protein, interleukin-6, tromboksan B2 plazme i leukotrien B4 (Cicerale i sur., 2010). Zanimljivo je da oleokantal (*p*-HPEA-EDA) inhibira aktivnost ciklooksigenaze-1 i ciklooksigenaze-2 na sličan načina kao i protuupalni lijek ibuprofen (Beauchamp i sur., 2005; Cicerale i sur., 2010). Hidroksitirosol kao jedan od značajnijih fenola maslinovog ulja upravo zbog svojeg snažnog antioksidacijskog učinka ima mnogobrojne kardioprotektivne učinke. Pokazalo se primjerice, da može inhibirati stres endoplazmatskog retikuluma u jetrenim stanicama što je značajno za prevenciju kardiovaskularnih bolesti (Giordano i sur., 2014). Nadalje, u staničnoj liniji preadipocita hidroksitirosol inhibira ekspresiju gena koji kodira kanabinoidni receptor tipa 1 (CB1) i koji je općenito važan u održavanju homeostaze tijela, što može pomoći u liječenju pretilosti (Tutino i sur., 2016). Utjecaj maslinovog ulja na kardiovaskularne bolesti istražen je i u jednom od najvažnijih istraživanja u području nutricionizma na ljudima s visokim rizikom obolijevanja od kardiovaskularnih bolesti PREDIMED (od španjolskog *Prevención con Dieta Mediterránea*). Glavni zaključak istraživanja PREDIMED je da prehrana koja uključuje ekstra djevičansko ulje ili orašaste plodove značajno smanjuje praćene komplikacije i razvoj kardiovaskularnih bolesti (Martínez-González i sur., 2015). Znanstvenici su pokušali utvrditi i koje su to točno komponente ovakvih prehrana zaslužne za zapaženi zaštitni učinak. Upravo su (poli)fenoli prepoznati kao komponente povezane s pozitivnim zdravstvenim učinkom (Medina-Remón i sur., 2015). Kolika je jačina dokazanih učinka fenolnih komponenti maslinovog ulja svjedoči i činjenica da maslinovo ulje koje sadrži 5 mg hidroksitirosola i njegovih derivata u 20 g ulja ima odobrenu zdravstvenu tvrdnju „Polifenoli maslinovog ulja doprinose zaštiti lipida u krvi od oksidacijskog stresa“ uz napomenu da se povoljan učinak postiže dnevnim unosom upravo te količine ulja (Europska Komisija, 2012).

Kemopreventivni učinak fenola maslinovog ulja još uvijek nije sasvim razjašnjen (Bernardini i Visioli, 2017). Usprkos tomu, pojedine studije ukazuju na to kako fenoli mogu imati zaštitni učinak

od nastanka karcinoma na način da pozitivno djeluju na redoks i upalni status odnosno posljedično na niz staničnih funkcija (Martín-Peláez i sur., 2013). Unos fenolima bogatog maslinovog ulja smanjuje oksidativno oštećenje DNK, što je važan mehanizam koji se povezuje sa razvojem tumora (Cicerale i sur., 2010). Hidroksitorosol i strukturno slične komponente su već istražene kao komponente s potencijalom prevencije nekoliko vrsta karcinoma, posebno onih povezanih s kolorektalnim traktom, mehanizmima koji uključuju poticanje degradacije receptora epidermalnog faktora rasta ili inhibiciju enzima povezanih sa promocijom/metastaziranjem tumora (Terzuoli i sur., 2016).

Fenoli maslinovog ulja hidrokisitirosol i tirosol pokazuju i neuroprotektivni učinak kod štakora (De La Cruz i sur., 2015), dok su istraživanja na miševima pokazala da konzumacija maslinovog ulja poboljšava pamćenje i učenje (Farr i sur., 2012). *In vitro* istraživanje je pokazalo da oleuropein i njegovi aglikoni imaju mogućnost prevencije Tau fibrilizacije, mehanizma koji pridonosi oštećenjima zamijećenim kod Alzheimerove bolesti i povezanih tauopatija (Daccache i sur., 2011).

Zdravstveni učinak fenola ovisi i o njihovoj bioraspoloživosti. Za fenole iz maslinovog ulja smatra se kako imaju visoku bioraspoloživost zahvaljujući dobroj topljivosti u vodi uz apsorpcijsku efikasnost od 55-66 mol%. *In vitro* istraživanja pokazuju da se fenoli maslinovog ulja uspješno apsorbiraju iz crijeva bez formiranja kilomikrona, malih lipoproteinskih čestica koje prenose lipide tijelom (Martín-Peláez i sur., 2013; Vissers i sur., 2004).

Osim fenolnih komponenti maslinovo ulje je i dobar izvor skvalena. Skvalen je terpenoidni ugljikovodik, a pripisuje mu se nekoliko pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje. Posjeduje antioksidacijsku aktivnost, smanjuje serumske koncentracije kolesterola te ima fotoprotektivna, antitumorska i kardioprotektivna svojstva (Gaforio i sur., 2015).

Stoga se maslinovo ulje bogato oleinskom kiselinom i mnogobrojnim bioaktivnim komponentama, može smatrati visokovrijednom namirnicom čije se djelovanje sistemski isprepliće na mnogim razinama. Pozitivan učinak maslinovog ulja na ljudsko zdravlje zasigurno je rezultat zajedničkog djelovanja svi njegovih sastavnica. Svakodnevni unos maslinovog ulja kao

cjelovite namirnice ključan je u postizanju pravilne prehrane koja će pridonijeti kvalitetnijem i dužem životnom vijeku.

1.4. Karakteristike maslinarsko-uljarske djelatnosti u Istarskoj županiji i ostalim hrvatskim maslinarskim regijama

Hrvatska kao mediteranska zemlja ima dugu tradiciju uzgoja masline i proizvodnje maslinovog ulja zahvaljujući povoljnoj klimi. Tome svjedoči i činjenica da je maslina najzastupljenija poljoprivredna kultura u obalnom dijelu Hrvatske. Sektor maslinarstva prvenstveno sačinjavaju obiteljska poljoprivredna gospodarstva, a u posljednjom razdoblju bilježi se povećanje proizvodnje i porast proizvodnih površina. U razdoblju od 2010. godine do 2014. godine u Hrvatskoj se prosječno proizvodilo 4,15 tisuća tona što je uz prosječnu potrošnju od 1,42 kg po stanovniku zadovoljavalo oko 70 % domaćih potreba. Za razliku od prijašnjih godina, 2014. godinu obilježila je velika količina oborina i veći napad bolesti i šetnika što je dovelo do drastičnog pada proizvodnje u Hrvatskoj. U toj je godini uvezeno čak 3,5 tisuća tona maslinovog ulja prvenstveno iz dviju najvećih maslinarskih zemalja Italije i Španjolske (Mesić i sur., 2015). Jedna od županija u Hrvatskoj koja se istaknula po kvaliteti maslinovog ulja je zasigurno Istarska županija. Popularizaciji maslinarsko-uljarske proizvodnje koja teži visokoj kvaliteti maslinovih ulja u velikoj je mjeri pridonijela i sve veća potražnja za djevičanskim maslinovim uljima što je rezultat uspješnog promoviranja dokazanih prednosti tih vrsta maslinovih ulja. Pokazalo se kako su ključni faktori za postizanje visoke kvalitete ulja mogućnost brze prerade ploda nakon berbe, usklađenost veličine kapaciteta pojedinačnih pogona s potrebama korisnika, visoka zastupljenost centrifugalnih sustava s 2 izlaza te visoka zastupljenost spremnika za ulje izrađenih od preporučenih materijala. Kao veći nedostaci ističu se manjak prostora za dugotrajnije skladištenje ulja u kontroliranim uvjetima, nedovoljna primjena inertne atmosfere u skladištenju ulja za prodaju te nedovoljna obrada i neprikladno uklanjanje biljne vode (Koprivnjak i Červar, 2010). Proizvodnja maslinovog ulja u Istri ali i ostalim maslinarskim regijama ima veliki potencijal, no potrebno je konstantno raditi na povećanju konkurentnosti prvenstveno kroz povećanje površina pod nasadima maslina, okrupnjavanjem tih površine te tehnološkim osuvremenjivanjem

proizvodnje uz dobru suradnju i integraciju svih sudionika, a uz veću kontrolu nad proizvodnjom i distribucijom. Također, potrebno je raditi na prepoznatljivosti hrvatskog maslinovog ulja na domaćem i svjetskom tržištu (Mesić, Lončar, Dolić, i Tomić, 2015). Naravno, da bi se to postiglo potrebno je analitički što bolje opisati hrvatska ulja kako bi se očuvala stalna kvaliteta i umanjila mogućnost krivotvorenja ili krivog deklariranja. Ovaj segment je posebno bitan kad nastupi maslinarski nepovoljna godina.

1.5. Oznaka izvornosti i zemljopisnog podrijetla maslina i maslinovog ulja

Tržište prehrambenih proizvoda zasićeno je mnogobrojnim proizvodima koji međusobno konkuriraju, a u takvim uvjetima nespecifični proizvodi lošije prolaze. Također, potrošači zahtijevaju određenu kvalitetu onoga što kupuju. Razvijanjem sustava za zaštitu proizvoda visoke kakvoće i specifičnih karakteristika željelo se upravo osigurati da takvi proizvodi budu vidljivi na tržištu te da potrošač bude siguran u njihovu kvalitetu. Na razini Europske Unije razvijeno je nekoliko razina oznaka: oznaka izvornosti ZOI (PDO od engl. *Protected designation of origin*), oznaka zemljopisnog podrijetla ZOZP (PGI od engl. *Protected geographical indication*) i zajamčeno tradicionalni specijaliteti poljoprivrednih i prehrambenih proizvoda ZTS (TSG engl. *Traditional specialties guaranteed*)(Sladonja i sur., 2006). Oznaka zemljopisnog podrijetla podrazumijeva naziv zemljopisnog područja ili neki drugi znak koji ukazuje da neki prehrambeni proizvod potječe iz određenog zemljopisnog područja zahvaljujući kojem posjeduje određenu kvalitetu i svojstva. Naspram tomu, oznaka izvornosti obavezno podrazumijeva značajni ili isključivi utjecaj posebnih prirodnih i ljudskih čimbenika zemljopisne sredine na proizašlu osobitu kvalitetu i svojstva prehrambenog proizvoda. Kod oznaka izvornosti se zahtijeva da se proizvodnja, priprema i obrada tog prehrambenog proizvoda u cijelosti odvijaju u naznačenom području (Državni zavod za intelektualno vlasništvo Republike Hrvatske, 2011). Oznaka „tradicionalni ugled“ naglašava tradicionalni karakter u sastavu ili značenju prehrambenog proizvoda. Oznake omogućavaju podizanje konkurentnosti proizvodnje pojedinih regija i podižu prepoznatljivost tih proizvoda. U Hrvatskoj je od 2005. godine omogućena ista zaštita proizvoda za proizvođače što se pokazalo veoma važnim, pogotovo nakon ulaska Hrvatske u EU. U maslinarsko-uljarskoj djelatnosti te su

oznake omogućile isticanje hrvatskih maslinovih ulja kako na domaćem tako i na europskom tržištu, a i šire. Da bi maslinovo ulje imalo oznaku izvornosti cijela proizvodnja, od uzgoja maslina sve do obrade mora se odvijati na određenom, definiranom zemljopisnom području. Za razliku od toga zaštita maslinovog ulja oznakom zemljopisnog podrijetla zahtjeva da to ulje ima specifičnu kakvoću koja je postojana i potrošačima lako prepoznatljiva (Sladonja i sur., 2006). Maslinova ulja zaštićena oznakom izvornosti na razini EU su Šoltansko maslinovo ulje, Krčko maslinovo ulje, Korčulansko maslinovo ulje i Ekstra djevičansko maslinovo ulje Cresa (European Commission, 2018). Istarsko ekstra djevičansko maslinovo ulje je zaštićeno prijelaznom oznakom izvornosti na nacionalnoj razini, a nakon neuspješne zaštite na razini EU zbog prigovora očekuje se nova zajednička specifikacija sa Slovenijom za zaštitu izvornosti maslinovog ulja iz cijele Istre, uključujući njen hrvatski i slovenski dio, ali i Liburniju ("Istarsko ulje dijeli oznaku 'Istra' sa Slovencima," 2017).

1.6. Utvrđivanje autentičnosti maslinovih ulja

Koncept autentičnosti hrane u širem smislu podrazumijeva kontrolu različitih prijevara, uključujući krivotvorenje, krivo deklariranje i krivo označavanje zemljopisnog podrijetla (Aparicio i sur., 2013; Bajoub i sur., 2018; Gallina Toschi i sur., 2013). Maslinovo ulje je namirnica koja se često spominje u kontekstu istraživanja autentičnosti. Ekstra djevičansko maslinovo ulje je najcjenjenija kategorija maslinovog ulja koja postiže značajno veće cijene na tržištu od ostalih kategorija maslinovih ulja, a njegova cijena značajno odudara od cijene rafiniranih biljnih ulja. Time postaje podložno različitim prijevarama uključujući krivotvorenje i krivo deklariranje (Škevin i sur., 2011). Zabrinutost potrošača i proizvođača po tom pitanju opravdano raste, stoga regulatorna tijela pokušavaju uspostaviti sustav kontrole koji će na najbolji način spriječiti ovakve načine prijevara. Zemlje diljem svijeta uvide različite zakone i pravilnike koji propisuju metode analize te definiraju dopuštene granice za pojedine komponente u maslinovom ulju s obzirom na kategoriju. Europska komisija propisuje standarde za EU, najvećeg proizvođača maslinovog ulja (European Commission, 1991). Veliku važnost ima i International Olive Council (IOC) koji okuplja

zemlje proizvođače maslinovog ulja i ostalih proizvoda od maslina. Ova međunarodna organizacija osigurava standardizaciju analitičkih metoda i propisuje granice (referentni interval) koje se koriste u analizi maslinovih ulja čime se osigurava ujednačena kontrola tih proizvoda diljem svijeta. No, uspostavljeni referentni intervali ponekad nisu linearno primjenjivi s obzirom na specifičnosti maslinovih ulja s određenih zemljopisnih područja. Stoga je potrebno istražiti i maslinova ulja s različitih područja uključujući i zemlje s manjom proizvodnjom, ali i nove zemlje proizvođače kako bi se tako široko analizirani parametri zajedno okupili u jedinstvene baze podataka (Bajoub i sur., 2018). Standardne rutinske metode za analizu kvalitete i autentičnosti maslinovih ulja primjenjuju se u svakodnevnoj kontroli, a najčešće se temelje na analizi pojedinih parametra. Za određivanje čistoće ulja danas je u pravilnicima propisano nekoliko metoda od kojih većina zahtjeva složeniju pripremu uzorka prije analize. Uz to sve te metode nisu uvijek adekvatne za praćenje autentičnosti maslinovih ulja, poput primjerice izvora krivotvorenja koji su po sastavu veoma slični s ekstra djevičanskim maslinovim uljima. Za krivotvorenja ekstra djevičanskih maslinovog ulja dodatkom ekonomski isplativijih ili manje kvalitetnih ulja, koriste se rafinirana maslinova ulja, deodorizirano maslinovo ulje, sirovo ulje komine maslina i esterificirana ulja te skoro sva ostala biljna ulja poput suncokretovog, lješnjakovog, kukuruznog i repičinog ulja (Aparicio i sur., 2013). Stoga je za analizu krivotvorenja nužno razvijati nove osjetljivije instrumentalne analitičke metode kojima se mogu detektirati promijene u sastavu ulja uslijed krivotvorenja učinkovitije od postojećih standardnih analitičkih metoda.

Druga problematika vezana uz autentičnost ulja je pitanje zemljopisnog područja. Naime, maslinova ulja s određenih zemljopisnih područja prepoznatljiva su kod potrošača zbog svoje dokazane nutritivne vrijednosti te bogatih i specifičnih senzorskih svojstva. Upravo ta dodatna vrijednost omogućava takvim proizvodima bolje plasiranje na nacionalnom i međunarodnom tržištu. Nažalost, i ovo postaje meta krivotvoritelja koji nerijetko krivo definiraju zemlju/regiju proizvodnje s ciljem većeg profita. Stoga, zakonodavstvo Europske unije pokušava zaštititi potrošače od krivotvorenja hrane i osigurati sljedivost hrane uspostavom sustava zaštićenih oznaka izvornosti (Casale i sur., 2012). Standardne rutinske metode po tom pitanju ne daju prave odgovore i ne omogućavaju praćenje točnosti deklariranja zemljopisnog podrijetla. Još jednom se potvrđuje potreba za razvijanjem novih analitičkih metoda koje će na brz način uz malu

potrošnju otapala omogućiti detektiranje i najmanjih nepravilnosti te osigurati adekvatnu provjeru autentičnosti maslinovih ulja.

1.6.1. Standardne rutinske metode za dokazivanje kvalitete i autentičnosti maslinovog ulja

Kontrola kvalitete maslinovih ulja danas, uključuje nekoliko kemijsko-fizikalnih metoda i senzorsku analizu. Kemijsko-fizikalne metode koje se koriste za određivanje hidrolitičkog i oksidacijskog kvarenja ulja su udjel slobodnih masnih kiselina, peroksidni broj i spektrofotometrijska metoda određivanja apsorbancije u UV području (European Commission, 1991). Od 2013. godine EU je uvela i sadržaj etil estera masnih kiselina kao pokazatelja kvalitete maslinovog ulja (European Commission, 2013). Etil esteri masnih kiselina mogu nastati već u samom plodu masline kao rezultat oštećenja, lošeg skladištenja ili procesiranja (Bajoub i sur., 2018). Udio slobodnih masnih kiselina bitan je parametar za klasifikaciju maslinovih ulja u komercijalne kategorije jer je to dobar pokazatelj hidrolitičkog kvarenja već u samom plodu masline. Vrijednost peroksidnog broja ponajviše govori o prisutnosti lipidne oksidacije jer obuhvaća primarne produkte oksidacije (Boskou, 1996). Spektrofotometrijska metoda određivanja apsorbancije u UV području podrazumijeva određivanje K vrijednosti 232 i 270 te ΔK , što je pokazatelj prisutnosti primarnih produkata oksidacije konjugiranih hidroperoksida i konjugiranih diena te sekundarnih produkata oksidacije konjugiranih triena, aldehida i ketona. K-brojevi zanimljivi su i u analizama autentičnosti maslinovog ulja jer konjugirani dieni i trieni nastaju i tijekom rafiniranja. Stoga se ova metoda koristi za otkrivanje dodatka rafiniranih maslinovih ili sjemenskih ulja u djevičanska maslinova ulja (Koprivnjak, 2006). Ostali parametri koji se analiziraju za potvrdu autentičnosti ulja su sastav masnih kiselina, *trans* izomeri masnih kiselina, sastav sterola i koncentracija ukupnih sterola, stigmastadieni, $\Delta E_{CN 42}$, voskovi, eritrodiol i uvaol te zasićene masne kiseline u položaju 2 na glicerolu. Analizirane vrijednosti se uspoređuju s propisanim graničnim vrijednostima. Kod sastava masnih kiselina bitno je da svih 13 masnih kiselina zadovoljavaju propisane vrijednosti, no po pitanju autentičnosti posebno je zanimljivo pratiti sadržaj miristinske, linolenske, arahidonske, gadoleinske, behenske i lignocerinske kiseline. $\Delta E_{CN 42}$ je metoda u kojoj se određuje razlika između teorijski izračunatog

i eksperimentalno određenog sadržaja triacilglicerola s ekvivalentnim brojem ugljika 42 (ECN 42). Za određivanje Δ ECN 42 potrebna je analiza sastava triacilglicerola, ali i masnih kiselina kako bi se ustanovilo moguće dodavanje ulja koja u svom sastavu imaju nezasićene masne kiseline. Stigmastadieni i *trans* izomeri masnih kiselina mogu biti indikatori provedenog postupka rafinacije zbog čega razotkrivaju dodatak rafiniranih biljnih ili maslinovih ulja. Sastav sterola karakterističan je za svako biljno ulje i time dobar pokazatelj autentičnosti ulja. Dodatak ulja komine maslina u djevičanska ulja učinkovito se detektira na temelju prisutnosti komponenti iz kože ploda masline voskova, eritrodila i uvaola, dok su pokazatelj dodatka esterificiranih ulja 2-gliceril monopalmirati (Bajoub i sur., 2018). Većina navedenih metoda sastoji se od nekoliko koraka počevši od pripreme uzorka do same instrumentalne analize i obrade dobivenih podataka. Analiza uzorka se provodi najčešće tehnikama kromatografije, bilo plinske ili tekućinske u ovisnosti o analiziranom parametru. Trenutni propisi ne zahtijevaju primjenu masenih detektora, a identifikacija svakog analita provodi se na temelju standarda. Izvođenje analiza iziskuje vještog analitičara uz veliku potrošnju kemikalija i reagensa. Također, jedna metoda ne može s potpunom sigurnošću ukazati na sve vrste krivotvorenja, a niti odrediti što je točno dodano u djevičansko maslinovo ulje već je potrebno kombinirati nekoliko metoda. No, navedene metode u mogućnosti su detektirati dodatak čak 1 % drugog biljnog ulja ili maslinovog ulja niže kategorije u djevičansko maslinovo ulje. Nažalost, dodatak određenih ulja poput lješnjakovog ulja i blago dezodoriziranog djevičanskog ulja nije moguće detektirati u malim količinama zbog velike sličnosti s maslinovim uljem po pitanju tih parametra (Calvano i sur., 2012; Christopoulou i sur., 2004).

1.6.2. Novi pristupi i analitičke metode u određivanju autentičnosti ulja

Razvoj novih i sofisticiranih analitičkih metoda za otkrivanje autentičnosti prehrambenih proizvoda nužan je s obzirom na sve veću potrebu praćenja sigurnosti i autentičnosti hrane. Zadnjih se godina intenzivno radilo na razvijanju takvih metoda uključujući pripremu uzorka, analizu uzorka i obradu podataka kako bi se povećala pouzdanost i brzina analize (Bajoub i sur., 2018). Naime, komponente maslinovog ulja podložne su varijabilnosti zbog utjecaja različitih

faktora kao što su primjerice okoliš, klima, agronomske tehnike, vrijeme berbe, ekstrakcijske tehnike i uvjeti skladištenja te nije svejedno kako će se uzorak pripremiti i analizirati, odnosno koji će se parametri obraditi (Baiano i sur., 2013). Pristup koji se temelji na analizi samo jedne komponente ulja može dati rezultate koji nisu samo u korelaciji sa zemljopisnim područjem, već i s ostalim faktorima. Stoga se danas daje prednost pristupima koji uzimaju u obzir više analita, a svoje zaključke temelje na informacijama dobivenim različitim tehnikama. Istraživanja autentičnosti maslinovog ulja uključuju različite kromatografske, spektroskopske i spektrometrijske metode koje daju informaciju o najzastupljenijim, ali i nekim manje prisutnim komponentama maslinovog ulja (Ben-Ayed i sur., 2013; Longobardi i sur., 2012b). Prednosti koje nude ove metode su visoka analitička rezolucija i mogućnost učinkovite separacije, brzina analize te niža potrošnja reagensa odnosno manja količina uzorka potrebna za analizu. Također, tri su moguće strategije za analizu maslinovih ulja u području istraživanja autentičnosti ulja: selektivna (ciljana) analiza, profiliranje i neselektivna (neciljana) analiza. Selektivna analiza podrazumijeva identifikaciju pojedinih komponenta ulja, određivanje sadržaja tih komponenta u ulju te povezivanje s zemljopisnim područjem. Za profiliranje koristi se sličan pristup, ali je ono usmjereno na identifikaciju i kvantifikaciju većeg broja povezanih komponenti. Nasuprot tomu, neselektivna analiza se temelji na određivanju „otiska prsta“ ulja i zahtjeva implementaciju kemometrijskih metoda. Neselektivne analize primjenom vibracijskih spektroskopskih tehnika posebno su se istakle svojim potencijalom u analizi maslinovih ulja (Casale i sur., 2012; Dupuy i sur., 2010; Rohman i sur., 2014; Sánchez-Rodríguez i sur., 2014). Mogućnosti vibracijskih spektroskopskih tehnika u otkrivanju zemljopisnog podrijetla hrane, uključujući i maslinovo ulje bile su ispitane i u petogodišnje projektu TRACE (EC, 2012). Naime, jedan od ciljeva projekta bio je i razvijanje procedura za analizu „otiska prsta“ hrane vibracijskim spektroskopskim tehnikama. Razvijene procedure u sklopu projekta pokazale su veliki potencijal za industrijsku primjenu u kontroli hrane. Prednost ovih tehnika je niska cijena, brzina analize i niska potrošnja reagensa, a sama analiza se provodi izravno na uzorku uz minimalnu pripremu te nakon analize uzorak ostaje u istom stanju (Bajoub i sur., 2018). Vibracijske spektroskopske tehnike temelje se na apsorpciji ili raspršenju elektromagnetskog zračenja, a u njih uključujemo infracrvenu spektroskopiju u bliskom infracrvenom području (NIR, od engl. *near infrared spectroscopy*,) i srednjem

infracrvenom području (MIR, od engl. *middle infrared spectroscopy*) te Ramanovu spektroskopiju (Jednačak i Novak, 2013). NIR spektroskopiju svakako valja izdvojiti kao jednu od metoda koja nudi mnogobrojna rješenja u analizi maslinovog ulja. Naime, NIR spektrima mogu se odrediti osnovni kemijski parametri i glavne komponente maslinovog ulja (Mailer, 2004), ali mogu se koristiti i u provjeri deklariranog podrijetla europskih maslinovih ulja (Woodcock i sur., 2008). Nuklearna magnetska rezonancija (NMR) je još jedna spektroskopska metoda koja pokazuje iznimne rezultate u analizi autentičnosti maslinovog ulja. Omogućava široki raspon analiza od selektivnih do neselektivnih „otisaka prsta“ kako bi se kvantificirale glavne komponente maslinovog ulja, detektirao dodatak nekog drugog ulja ili odredilo zemljopisno područje (Aghemo i sur., 2012; Alonso-Salces i sur., 2010; Dais i Hatzakis, 2013). Međutim, veliki nedostatak ove tehnologije je u malom broju ovih instrumenta na terenu te njihova visoka cijena. Masena spektrometrija (MS), također važna analitička metoda, trenutno je jedna od vodećih analitičkih tehnologija te je neizbježna i u istraživanju autentičnosti maslinovog ulja. Pri tome se koriste različite konfiguracije MS instrumenata što omogućava selektivne analize pojedinih komponenta maslinovog ulja, profiliranje većeg broja komponenti ali i neselektivne analize. Matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom s analizatorom vremena proleta (MALDI-TOF) se pokazala uspješnom u otkrivanju krivotvorenja maslinovog ulja s lješnjakovim uljem (Calvano i sur., 2012) ili u karakterizaciji izraelskih maslinovih ulja dobivenih iz različitih sorti maslina (Chapagain and Wiesman, 2009). Rezultati dobiveni uz pomoć MS s ionizacijom elektroraspršenjem (ESI) uz odgovarajuću statističku obradu, pokazuju iznimnu moć ove kombinacije u diferencijaciji ekstra djevičanskog maslinovog ulja od ostalih jeftinijih biljnih ulja (Alves i sur., 2014). MS s kemijskom ionizacijom pri atmosferskom tlaku (APCI) i analizatorom ionskom stupicom se koristila u istraživanju krivotvorenja maslinovog ulja sa sojinim uljem, ali i za klasifikaciju ulja europskog i argentinskog podrijetla (Fasciotti i Pereira Netto, 2010). Prednosti koje pruža MS, posebice u direktnom pristupu u kojem se unosi cijeli uzorak bez prethodne izolacije pojedinih komponenti, su pojednostavljenje pripreme uzorka čime se umanjuje mogućnost pogreške (Bajoub i sur., 2018). Maseni spektar, rezultat MS analize, daje informaciju o masi, tj. ovisnost mase o naboju (m/z) što omogućava identifikaciju analita, a istovremeno se umanjuje ovisnost analize o standardu. Tandemski instrumenti pružaju i mogućnost

fragmentacije analita u svrhu točne strukturne identifikacije. Povezivanje MS s kromatografijom kao početnim korakom za bolju separaciju analita, olakšava kasniju identifikaciju (Rubert i sur., 2015). Nažalost, trenutno maseni spektromeri zbog visoke cijene nisu dio svakog laboratorija koji se bavi istraživanjem ili kontrolom hrane iako njihova zastupljenost raste.

Od ostalih analitičkih pristupa potrebno je spomenuti tehnologije bazirane na DNK analizi. Molekularne metode kojim se određuju genetski profili neophodne su za provjeru identiteta sorti maslina, ali se mogu koristiti i za praćenje autentičnosti maslinovog ulja. U analizi krivotvorenja maslinovog ulja koristili su se različiti molekularni markeri poput jednostavne ponavljajuće sekvence (SSR, od engl. *simple sequence repeats*). Glavne prednost ovih metoda su specifičnost i osjetljivost, ali i neovisnost o vanjskim okolišnim uvjetima. Iako, ponovljivost i pouzdanost metoda značajno ovisi o kvaliteti izoliranog DNK (Bajoub i sur., 2018).

1.7. Instrumentalne metode za analizu lipida

Lipidi se tradicionalno analiziraju kromatografskim metodama poput tankoslojne kromatografije (TLC) ili tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). TLC analiza je jednostavna i praktična metoda za separaciju i identifikaciju lipida uz niske troškove, a omogućava i kvantifikaciju lipida ukoliko su standardi dostupni (Fuchs i sur., 2011). Usprkos činjenici da je to uhodana metoda za analizu lipida, uz nju se vežu određena ograničenja. Naime, identifikacija svih lipida u kompleksnijim uzorcima nije uvijek moguća, a sama detekcija lipida u velikoj mjeri ovisi o sastavu masno kiselinskih ostataka. Uz to postoje i ograničenja metode po pitanju rezolucije (Christie i Han, 2010; Schiller i Fuchs, 2013). Kod analize lipida metodom HPLC koriste se različiti detektori, a jedan od češće korištenih za analizu triacilglicerola je detektor indeksa refrakcije (RID). Za razliku od UV detektora, RID ima bolju osjetljivost na zasićene triacilglicerole, ali ne podržava primjenu gradijentne elucije mobilne faze što utječe na mogućnost efikasne separacije (Beccaria i sur., 2016). Osim kromatografskih metoda u analizi lipida često se koriste i spektroskopske metode. NMR usprkos niskoj osjetljivosti pruža potpunu strukturnu

karakterizaciju lipida. Prednosti NMR leže u tome što omogućava otkrivanje pozicije dvostruke veze unutar lipida te razlikuje *cis/trans* izomere i pozicijske izomere (Fuchs i sur., 2011). Najčešće se koriste ^1H i ^{13}C NMR, a kod analize fosfolipida značajne prednosti pokazuje ^{31}P NMR. Ipak NMR nije toliko pouzdana metoda u analizi kompleksnijih uzoraka koji sadrže mnogobrojne različite lipide, stoga što dolazi do preklapanja signala. U današnjim istraživanjima MS je jedna od najšire primjenjivih tehnologija u analizi lipida zbog niza prednosti, iako i ona ima određena ograničenja. U analizi lipida zadnjih godina koristili su se različiti ionski izvori (ESI, APCI i MALDI), iako se određena prednost daje ionizaciji ESI (Schiller and Fuchs, 2013). ESI-MS daje informaciju o točnoj masi lipida te omogućava identifikaciju pojedinih masno kiselinskih ostataka unutar lipida (Cozzolino i De Giulio, 2011). ESI proizvodi stabilne ione amonijeve ili natrijeve adukte, a ograničenja su zamijećena po pitanju osjetljivosti (Indelicato i sur., 2017). APCI-MS i MALDI-MS nisu često korištene metode, ali pružaju nove mogućnosti u analizi lipida. APCI-MS kao i ESI-MS omogućava primjerice, detekciju pozicijskih izomera, ali uz znatno manje kompleksne spektre (Smaniotto i sur., 2008). MALDI-MS, tj. najčešća konfiguracija MALDI-TOF/MS u analizi lipida pokazala se kao brza i kvalitetna metoda za identifikaciju lipida, ali i njihovu kvantifikaciju (Schiller i Fuchs, 2013). Kombinirani pristup u kojem se zajedno koriste kromatografija i masena spektrometrija ili NMR spektroskopija otvorili su sasvim nove mogućnosti u analizi složenijih uzoraka lipida. Posebno je ovim pristupima nadvladan problem supresije određenih lipidnih klasa koji je uočen kod analize lipidnih mješavina, što se postiglo spajanjem brzih separacijskih tehnika s MS (Emerson i sur., 2010). Danas se naime, uobičajeno prije analize na ESI-MS, lipidi uspješno razdvajaju tekućinskom kromatografijom (Cozzolino i De Giulio, 2011). Razvojem tzv „mekanih“ tehnika ionizacija pojavila se i mogućnost kombiniranja TLC s MS. U tu svrhu koriste se različiti ionski izvori, a posebno se uspješnom pokazala kombinacija TLC s MALDI MS s obzirom da ne zahtjeva ekstrakciju uzorka s TLC ploče. Takva je analiza stoga brza čime se umanjuje mogućnost degradacije uzorka, a s obzirom na klasičnu TLC analizu poboljšana je i rezolucija (Fuchs i sur., 2011). MS analizom lipida dobiva se djelomična strukturna informacija o lipidima. Cjelovitija strukturna karakterizacija lipida postignuta je primjenom kolizijski izazvane disocijacije (CID) iona u tandemskoj masenoj spektrometriji (Indelicato i sur., 2017).

1.7.1. MALDI-TOF/MS i njegova primjena u analizi lipida

1.7.1.1. Princip rada MALDI-TOF/MS

MALDI ionski izvor najčešće se nalazi u kombinaciji s analizatorom TOF koji radi po principu proleta ioniziranih čestica do detektora. Ova kombinacija je najčešća zbog toga što se MALDI prvenstveno koristi u analizi velikih molekula, a upravo TOF ima neograničeno područje masa, ali i zbog pulsirajućeg generiranja iona kod MALDI ionizacije koji najviše odgovara TOF analizatorima (Fuchs i sur., 2010). U procesu ionizacije koristi se matrica koja apsorbira energiju lasera te time pokreće ionizaciju i nastanak iona analita. Naime, pulsirajućim zrakama lasera gađa se uzorak nanesen zajedno s matricom na MALDI pločicu. Matrica koja se nalazi u suvišku apsorbira energiju te prelazi u plinovito stanje prenoseći netaknute molekule analita u plinovito stanje te dolazi do razmjene jednostruko nabijenih iona između matrice i analita. Naposljetku se stvaraju nabijene molekule analita koje nazivamo aduktima. Formirani ioni se ubrzavaju u električnom polju, a nakon što prođu nabijenu rešetku nesputano lete u prostoru brzinom koja je određena njihovom masom (Hillenkamp i Peter-Katalinic, 2013). Naime, princip rada TOF analizatora temelji se na pravilu da brzina iona izravno ovisi o masi iona te se na temelju tog postiže separacija iona. Analizatori TOF mogu imati ugrađeno i ionsko ogledalo koje osigurava da ioni istih masa i različitih kinetičkih energija stignu istovremeno do detektora te se tada zovu reflektorski TOF (Cindric i sur., 2009). Kod reflektorskih TOF analizatora umanjuju se razlike u početnoj brzini iona te se produžuje putanja iona čime se povećava rezolucija spektra masa i smanjuje se širina pika. Komercijalno dostupni MALDI-TOF instrumenti s reflektorskom konfiguracijom imaju rezoluciju masa iznad 10000 i točnost masa oko 30 ppm (Fuchs i sur., 2010).

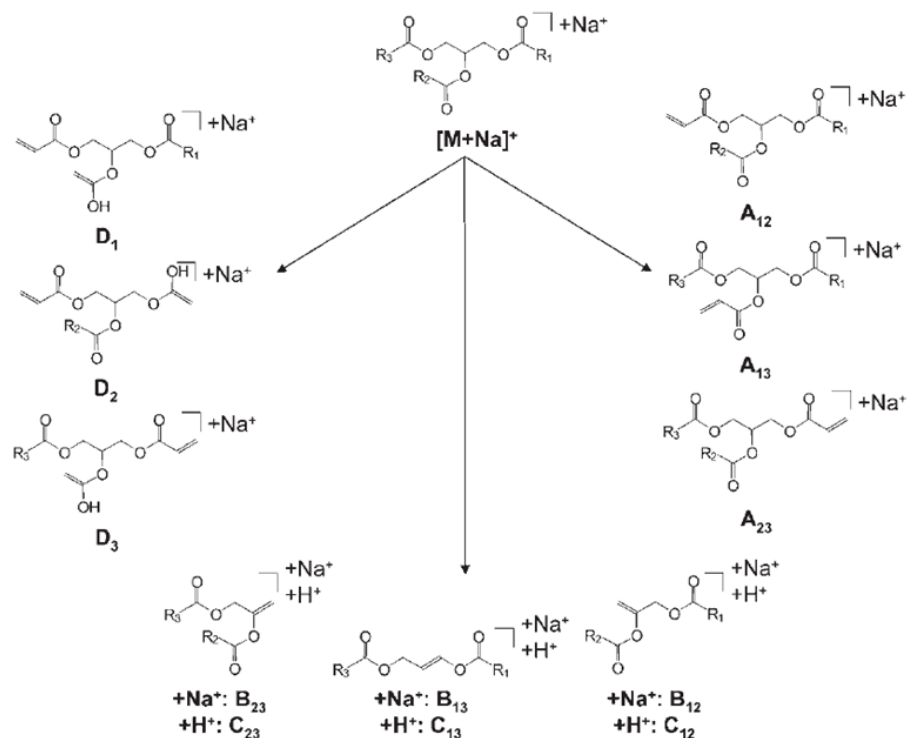
1.7.1.2. MALDI-TOF/MS u analizi lipida

Iako je matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijskom najčešće u kombinaciji s analizatorom vremena proleta primarno uspostavljena za analizu proteina, ona se može vrlo uspješno koristiti i u analizi lipida. MALDI-TOF/MS je naime, brza i osjetljiva tehnika koja se uspješno koristi u analizi uzoraka s nečistoćama. Dobiveni maseni spektri lipida su veoma jasni i

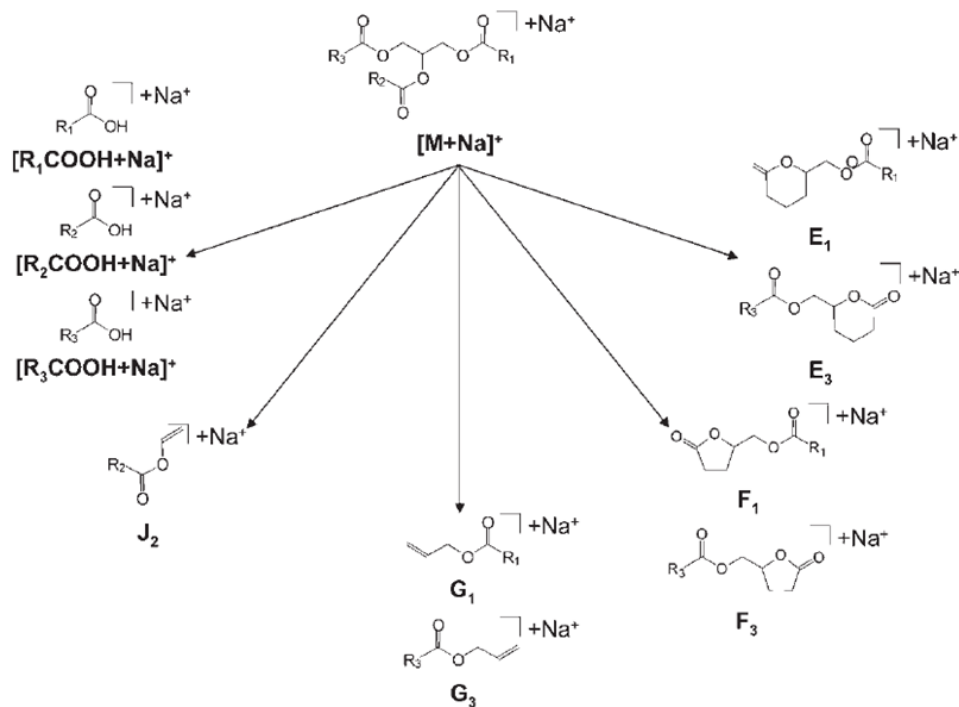
jednostavni zahvaljujući tome što je razina stvaranja fragmenta analita kod same ionizacije niska (Fuchs i sur., 2010). Nanošenjem nitroceluloznog filma na MALDI pločicu prije samog nanošenja uzorka lipida dodatno se smanjuje fragmentacija tijekom ionizacije. Nadalje, nitrocelulozni film dodatno povećava reproducibilnost između laserskih udaraca zbog homogenosti kristalizacije matrice/analita (Picariello i sur., 2010). Triacilgliceroli se najbolje analiziraju u pozitivnom načinu rada MALDI korištenjem 2,5-dihidroksibenzoične kiseline (DHB) kao matrice. Dobiveni MALDI spektri primarno sadrže adukte alkalnih metala pogotovo Na^+ adukte, dok H^+ adukti nisu nikad vidljivi. U spektru uz natrijeve adukte često su i većim intenzitetom prisutni ioni kojima nedostaje natrijev masno kiselinski ostatak (Fuchs i sur., 2010). Osim DHB, u analizi TAG testirane su i druge matrice iako je zahvaljujući pozitivnim karakteristikama DHB najčešće korištena matrica. Osim što DHB ne producira značajan broj iona i omogućava snimanje u pozitivnom i negativnom načinu rada, osigurava najbolju reproducibilnost i osjetljivost kod analize TAG.

U analizi TAG veliki izazov predstavlja strukturna karakterizacija. Složenost molekulske strukture triacilglicerola odraz je vrste masnih kiselina koje se nalaze na samoj gliceridnoj okosnici. Unutar triacilglicerola mogu se razlikovati dužina lanca i stupanj nezasićenosti masno kiselinskih ostataka. Triacilgliceroli se razlikuju i s obzirom na distribuciju masnih kiselina između *sn*-1, *sn*-2 i *sn*-3 pozicija na gliceridnoj okosnici (Chapagain i Wiesman, 2009). Sve su to izazovi koji su se u MS prevladali tek tehnološkom mogućnošću fragmentacije. Matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom s tandemskim analizatorom vremena proleta (MALDI-TOF/TOF) je zasigurno važna tehnika u strukturnoj analizi lipida. Ioni dobiveni kolizijski izazvanom disocijacijom omogućavaju potpunu strukturnu analizu triacilglicerola. Naime, ioni iz visokog *m/z* područja CID spektra nastaju cijepanjem pojedinih ugljikovih atoma te su stoga indikativni za određivanje dvostruke veze unutar masno kiselinskih ostataka. Za razliku od toga, ioni s niskim *m/z* vrijednostima omogućavaju određivanje pozicijske distribucije masnih kiselina na gliceridnoj okosnici (Cheng i sur., 1998; Pittenauer i Allmaier, 2009). Nomenklatura pojedinih fragmentacijskih iona iznesena je u istraživanju koji su proveli Cheng i sur. (1998) te kasnije prihvaćena od ostalih istraživača. Tako razlikujemo A-, B-C-, D-, E- F-, J- i G- tip iona čije su pripadajuće strukture prikazane na slikama 2 i 3.

MALDI-TOF/TOF analiza lipida omogućila je novi uvid u strukturnu karakterizaciju tih vrsta iako nisu odmah riješeni svi problemi. Naime, jedno od ograničenja visoko energetskog CID je nemogućnost potpunog selektivnog prikupljanja prekursorskih iona što predstavlja problem kod TAG koji imaju veoma bliske m/z vrijednosti. Ova se pojava pripisuje nedovoljno dugoj putanji iona u MS1 (Pittenauer i Allmaier, 2009). Razvoj tehnologije u području TOF analizatora pružio je nove opcije koje pokušavaju prevladati ovaj problem. Veliki napredak predstavlja MALDI-SpiralTOF/TOF koji uz pomoć 15 m dugog spiralnog puta i mogućnosti uklanjanja post-izvorskog raspadanja iona omogućava selektivnije prikupljanje TAG prekursorskih iona bez interferencije s vrstama koje se razlikuju u samo jednoj dvostrukoj vezi (Kubo i sur., 2013).



Slika 2. Produkt ioni nastali fragmentacijom natrijevih adukta triacilglicerola ($M+Na^+$) koji omogućavaju određivanje masnih kiselina koje su prisutne u TAG, ali ne i njihovu pozicijsku raspodjelu: A- tip iona nastaje „charge-remote“ fragmentacijom masno kiselinskih ostataka, B- i C- tip iona ukazuju koje su masne kiseline u TAG, a D- tip iona je rezultat gubitka ugljikovodičnih lanaca dvaju masno kiselinskih ostataka (Pittenauer i Allmaier, 2009).



Slika 3. Produkt ioni koji nastaju fragmentacijom natrijevog adukta triacilglicerola ($M+Na^+$), a omogućavaju određivanje pozicijske raspodjele pojedinih masno kiselinskih ostataka unutar gliceridne okosnice: E-, F- i G- tip iona nastaju od masno kiselinskih ostataka na *sn*-1 i *sn*-3 poziciji, dok je J- tip iona karakterističan za poziciju *sn*-2 (Pittenauer i Allmaier, 2009).

1.8. Metode analize glavnih komponenta maslinovog ulja u svrhu karakterizacije i dokazivanja autentičnosti

1.8.1. Analiza triacilglicerola u biljnim uljima s posebnim naglaskom na maslinovo ulje

Masne kiseline u biljnim uljima prisutne su u obliku estera te većim djelom čine triacilglicerole. Osnovna tehnologija za analizu TAG u biljnim uljima je HPLC-RID. TAG se na koloni razdvajaju na temelju broja ugljika i nezasićenih veza, a najčešće mobilna faza u analizi kromatografijom obrnutih faza je mješavina acetona i acetonitrila. Pošto RID zahtjeva izokratno eluiranje mobilne faze ne postiže se potpuno razdvajanje svih TAG. Kako bi se poboljšala separacija testirana su različita otapala poput propionitrila (Ollivier i sur., 2003). Usprkos tomu separacija regioizomera,

cis/trans stereoizomera i enantiomera nije bila moguća uz uporabu kromatografije obrnutih faza (Indelicato i sur., 2017). HPLC metoda za analizu TAG u biljnim uljima rađena su u svrhu karakterizacije tih ulja i određivanja njihove autentičnosti. Kombinirani pristup profiliranja TAG uz pomoć HPLC i kemometrije pokazao se uspješnim za provjeru zemljopisnog podrijetla maslinovih ulja (Bajoub i sur., 2016; Longobardi i sur., 2012a; Ollivier i sur., 2003) ili sortnosti ulja (Aranda i sur., 2004). Zanimljivo je kako kod većine europskih ulja dominantna količina trioleina (OOO) naspram trilinoleina (LLL) ukazuje na autentičnost maslinovog ulja (Ollivier i sur., 2003). Analiza TAG na HPLC-RID u svrhu izračuna Δ ECN 42 nesumnjivo je odlična metoda za otkrivanje krivotvorenja maslinovog ulja sa suncokretovim, sojinim, pamukovim, kukuruznim, orahovim, sezamovim ili repičinim uljem i to već pri malim količinama. Usprkos tome dodatak lješnjakovog i bademovog ulja na razini od 5 % ili manje zbog velike sličnosti sa maslinovom uljem ne može se detektirati ovom metodom (Christopoulou i sur., 2004). Metoda HPLC se koristila i za praćenje sastava maslinovog ulja tijekom sazrijevanja čime su uočene promjene u sadržaju pojedinih TAG (Yorulmaz i sur., 2013). Na istom principu kako se istražuje krivotvorenje maslinovog ulja, provedena je i analiza autentičnosti bučinog ulja (Butinar i sur., 2010), dok je kemometrijska obrada sastava TAG omogućila otkrivanje krivotvorenja sezamovog ulja (Lee i sur., 2001). Usprkos širokoj primjeni HPLC u analizi biljnih ulja uz već napomenute izazove vezane uz separaciju TAG, postoje određeni drugi nedostaci metode koji mogu utjecati na kvalitetu rezultata. Prije kromatografske analize poželjno je ekstrahirati frakciju TAG iz biljnog ulja što može narušiti integritet samog uzorka, a pravilna identifikacija TAG je ograničena na dostupne standarde. Pošto su biljna ulja kao uzorci vrlo kompleksni testirana je i kombinacija više separacijskih dimenzija putem 2D LC. No, danas najčešći izbor za kvalitativne i kvantitativne analize TAG iz biljnih ulja je kombinacija kromatografije i MS. U segmentu MS APCI-MS je jedna od najraširenijih tehnologija za analizu TAG stoga što generira jednostavne masene spektre te ima mogućnost identifikacije pozicijskih izomera (Indelicato i sur., 2017). Kao brza alternativa određivanju triacilglicerola predložena je i metoda MALDI MS. MALDI MS ima dobru rezoluciju u masenom području triacilglicerola što pridonosi razlikovanju biljnih ulja čiji se triacilgliceroli razlikuju samo po stupnju nezasićenosti. Bitna prednost ove metode je i brza priprema uzorka bez potrebe za prethodnim pročišćavanjem analita, kemijske modifikacije ili derivatizacije što smanjuje mogućnost pogreške,

ali i ubrzava proces analize (Aparicio i sur., 2013). MALDI MS metoda koristila se u karakterizaciji maslinovih ulja s izraelskog područja (Chapagain i Wiesman, 2009). Autori su zaključili da je MALDI-TOF/MS tehnologija omogućila jednostavno i brzo prikupljanje profila TAG i masnih kiselina iz maslinovog ulja. MALDI-TOF/MS je metoda kojom su se dobili karakteristični TAG profili različitih biljnih ulja i masti (Badu i Awudza, 2017; Bail i sur., 2009; Jakab i sur., 2002; Saraiva i sur., 2009). Jakab i sur. (2002) su zaključili da MALDI-TOF/MS u usporedbi s HPLC/APCI-MS i u kombinaciji s linearnom diskriminantnom analizom (LDA) daje bolje rezultate u razlikovanju biljnih ulja na temelju sastava TAG. Koliko je profil TAG vezan uz vrstu ulja i u kojim postocima se može zamijetiti dodavanje jednog biljnog ulja u drugo biljno ulje testirali su Di Girolamo i sur. (2015). Kombinacija MALDI-TOF/MS analize TAG i statistička obrada omogućila je otkrivanje vrlo niske razine, čak 0,5 %, kukuruznog ulja u maslinovom ulju. Nadalje, MALDI-TOF/MS se koristio i za praćenje lipidnih promjena koje nastaju starenjem ulja (Asbury i sur., 1999). Za potpunu strukturnu karakterizaciju triacilglicerola iz biljnih ulja uz identifikaciju pozicijskih izomera na gliceridnoj okosnici u te poziciju dvostrukih veza unutar masno kiselinskih ostataka predložena je tandemaska masena spektrometrija TOF/TOF (Kubo i sur., 2013; Pittenauer i Allmaier, 2009; Shimma i sur., 2012). Uz mnogobrojne prednosti koje pružaju, metode koje podrazumijevaju upotrebu MS često zahtijevaju i velika financijska ulaganja zbog čega je njihova implementacija u kontrolne laboratorije relativno ograničena (Bajoub i sur., 2018).

1.8.2. Analiza masnih kiselina u biljnim uljima s posebnim naglaskom na maslinovo ulje

Određivanje sastava masnih kiselina već je dugo prihvaćeno kao osnovna metoda za karakterizaciju biljnih ulja uključujući ekstra djevičansko maslinovo ulje. Promjene u sastavu masnih kiselina u ekstra djevičanskom maslinovom ulju mogu upućivati na krivotvorenje s drugim biljnim uljem ili rafiniranim uljima iz ploda masline (Christopoulou i sur., 2004). Sastav masnih kiselina, tj. omjer između zasićenih i nezasićenih masnih kiselina koristan je i za određivanje sorte maslinovog ulja (Aranda i sur., 2004; Semmar i sur., 2016; Stefanoudaki i sur., 1999). Veliki utjecaj na sastav masnih kiselina ima i zemljopisno podrijetlo maslinovog ulja zbog specifičnih pedoklimatskih uvjeta pojedinog područja te ostalih čimbenika vezanih uz to područje. Maslinova

ulja sa viših nadmorskih visina i hladnijom klimom odlikuju se većim koncentracijama oleinske kiseline dok će maslinova ulja s nižih toplijih područja karakterizirati veći sadržaj zasićenih kiselina i linolne kiseline (Issaoui i sur., 2010; Stefanoudaki i sur., 1999). Naspram tomu, promjene u sastavu masnih kiselina u maslinovom ulju nisu uvijek prisutne kod ulja dobivenih od maslina u različitim fazama sazrijevanja (Škevin i sur., 2003). Analiza masnih kiselina uhodana je metoda u mnogobrojnim laboratorijima koji se bave istraživanjem ulja. Masne kiseline se nakon izdvajanja iz triacilglicerola prevode u metil estere masnih kiselina kako bi se poboljšala njihova hlapljivost i omogućila analiza. Plinska kromatografija s plameno ionizacijskim detektorom priznata je kao službena metoda kvantifikacije masnih kiselina (Aparicio i sur., 2013). Za identifikaciju metil estera masnih kiselina koriste se standardi, a njihov sadržaj se izražava kao postotni udio. Nadogradnja ove metode je integrirani sustav za plinsku kromatografiju s masenim detektorom (GC MS) koji pruža sve prednosti MS i stoga omogućava pouzdanu identifikaciju i kvantifikaciju pojedinih masnih kiselina (Yang i sur., 2013). Osim istraživanja maslinovog ulja ova konfiguracija instrumenata se koristila u detektiranju krivotvorenja i kod drugih visokovrijednih ulja (Xie i sur., 2013).

Usprkos činjenici da je analiza metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom pokazala uspješna metoda za otkrivanje mnogobrojnih krivotvorenja, još uvijek se ovom metodom ne mogu otkriti dodaci biljnih ulja koji dijele sličan sastav masnih kiselina. Kod maslinovog ulja su to prvenstveno ulja koja posjeduju prirodno visoki sadržaj oleinske kiseline (lješnjakovo ulje) ili određene sorte biljnih ulja sa visokim sadržajem oleinske kiseline (suncokretovo, repičino ulje ili ulje šafranike) (Beccaria i sur., 2016).

1.9. NIR spektroskopija i njezina primjena u analizi maslinovog ulja

1.9.1. NIR spektroskopija

Vibracijska spektroskopija u koju spada i infracrvena (IR) spektroskopija koristi se za identifikaciju molekula temeljem vibracija njihovih atoma, točnije periodičke promjene međuatomske udaljenosti i kutova. Ovisno o energiji apsorbiranog kvanta zračenja, u pojedinoj molekuli se

pobuđuju određene vibracije pojedinih funkcionalnih skupina, a zbog slabe sprege s ostalim vibracijama, one se mogu promatrati odvojeno. U slučaju IR spektroskopije proučavanje interakcije tvari i elektromagnetskog zračenja odvija se u rasponu valnih duljina od 0,8 μm do 1000 μm odnosno valnih brojeva od 12 500 cm^{-1} do 10 cm^{-1} . Rezultat analize je IR spektar koji pokazuje ovisnost apsorbancije ili transmisije o valnom broju ili valnoj duljini. Vibracijska spektroskopija omogućava neselektivne analize uzorka čime se dobiva „otisak prsta“ svakog uzorka što se pokazalo izuzetno bitnim u istraživanju autentičnosti hrane (Esslinger i sur., 2014).

1.9.2. NIR spektroskopija (NIRS) u analizi biljnih ulja s naglaskom na maslinovo ulje

NIRS je spektroskopska tehnika kojom se na brz i nedestruktivan način analiziraju maslinova ulja te uz statističku obradu dobivenih podataka dobiju se relevantni podaci za utvrđivanje autentičnosti maslinovog ulja (Casale i sur., 2012; Laroussi-Mezghani i sur., 2015; Nunes, 2014). Iako NIR spektri biljnih ulja nisu sami po sebi značajan izvor informacija, oni ukazuju na postojanje određenih struktura ili prisutnost kemijskih veza koji odgovaraju određenim funkcionalnim grupama biomolekula. U području NIR spektra od 1000 do 2500 nm primarno su vidljiva preklapanja i kombinacije vibracija C-H, O-H i N-H veza. Kod biljnih ulja u tom području prevladavaju vibracije C-H funkcionalnih grupa pošto one čine najveći dio masnih kiselina (tablica 2). Regija A ima najintenzivniji pik oko 1210 nm koji se pripisuje drugom preklapanju C-H rastezanja. Regija B je rezultat C-H rastezanja te ostalih vibracija, a najveći je pik oko 1392 nm popraćen s prvim preklapanjem iz molekula H_2O . Regija C ima najveću apsorbanciju oko 1725 i 1760 nm zbog prvog preklapanja C-H vibracijskih rastezanja metil, metilen i etenil skupina. Kod ulja bogatih oleinskom kiselinom, kao što je to primjerice maslinovo ulje, u regiji C dominira pik pri 1725 nm. Zasićene masne kiseline zbog svoje manje zastupljenosti u takvim uljima imaju manje intenzivan pik pri 1760 nm koji nastaje zbog $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ funkcionalnih skupina. Regija D za biljna ulja nema veliki značaj pošto je odraz sadržaja vode. Regija E je odraz sadržaja nezasićenih masnih kiselina, tj. *cis* dvostrukih veza iz $-\text{CH}=\text{CH}-$ koji se nalaze u oleinskoj, linolnoj i linolenskoj masnoj kiselini. Regija F ima najintenzivniju apsorpciju kod ulja zbog rastezanja C-H i savijanja kod metil i metilen funkcionalnih skupina (Westad i sur., 2008). Naravno, kako bi sve ove regije i

ukupan spektar imali smisla potrebno je provesti statističku obradu podataka. Modeli dobiveni metodom parcijalnog najmanjeg kvadrata (PLS) u kojima se kao ulazni parametar koristio NIR spektar maslinovog ulja, uspješno su primijenjeni u kontroli kvalitete i karakterizaciji djevičanskih maslinovih ulja tijekom same proizvodnje (Jiménez Marquez i sur., 2005). NIR spektar odličan je ulazni parametar i u modelima za predikciju sadržaja zastupljenijih masnih kiselina (oleinske i linolne), dok su nešto lošije predikcijske mogućnosti ostvarene za manje zastupljene masne kiseline (Mailer, 2004).

Tablica 2. Glavna područja NIR za ulja i masti te području pripadajuće biomolekule (Hourant i sur., 2000; Westad i sur., 2008)

Regija	Valna duljina nm	Molekula	Vibracija
A	1090-1180	-CH ₂	2. preklapanje
	1100-1200	-CH ₃	
	1150-1260	-CH=CH-	
B	1350-1430	-CH ₂	kombinacija
	1360-1420	-CH ₃	
	1390-1450	H ₂ O	1. preklapanje
C	1650-1850	-CH ₂	1. preklapanje
		-CH ₃	
		-CH=CH-	
D	1880-1930	H ₂ O	kombinacija
	2010-2020	-CH=CH-	
E	2100-2200	-CH=CH-	kombinacija
F	2240-2360	-CH ₃	kombinacija
	2290-2470	-CH ₂	

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj ovog istraživanja je razvoj protokola za točnu i brzu karakterizaciju i analizu autentičnosti maslinovog ulja iz Hrvatske uz pomoć visokoprotočnih instrumentalnih metoda temeljenih na masenoj spektrometriji u kombinaciji s kemometrijom te analiza utjecaja zemljopisnog područja na sastav i udio masnih kiselina, triacilglicerola i NIR spektar maslinovih ulja s područja Istre, Kvarnera i Dalmacije (Republika Hrvatska).

Prva hipoteza je kako će visokoprotodne instrumentalne metode temeljene na masenoj spektrometriji u kombinaciji s kemometrijom dati podatke kojima će se unaprijediti analiza lipidnih komponenti, a time i analiza zemljopisnog podrijetla maslinovih ulja te nadići ograničenja standardnih metoda. Nadalje, istraživanje se temelji i na hipotezi povezanosti sastava maslinovog ulja u pogledu masnih kiselina, triacilglicerola i NIR profila sa zemljopisnim područjem. Iz temeljne hipoteze proizašla je hipoteza da su određene specifične značajke ulja osnova za otkrivanje autentičnosti ulja.

Specifični ciljevi istraživanja koji prate plan rada su sljedeći:

1. Razvoj analitičkih protokola temeljenih na sofisticiranim i brzim instrumentalnim platformama masene spektrometrije za molekularno profiliranje lipidnih komponenti maslinovog ulja.
2. Utvrđivanje osnovnih kemijskih parametara (slobodne masne kiseline, peroksidni broj, K_{232} , K_{270} i ΔK) hrvatskih maslinovih ulja kako bi se definirala njihova kvaliteta i provela kategorizacija u skladu sa zahtjevima propisanim pravilnikom.
3. Utvrđivanje sastava dominantnih komponenti (triacilglicerola i masnih kiselina) u hrvatskim maslinovim uljima, s posebnim naglaskom na ulja s istarskog područja.
4. Nadogradnja selektivnog pristupa analize maslinovog ulja s neselektivnom karakterizacijom uz pomoć metode bliskog infracrvenog spektra.
5. Razvoj integriranih protokola za profiliranje organskih uzoraka koji se temelje na visokoprotodnim metodama u kombinaciji sa statistikom.

6. Analiza povezanosti dominantnih komponenti i NIR spektara maslinovog ulja sa zemljopisnim podrijetlom.
7. Razvoj predikcijskih modela uz pomoć kemometrijskih metoda za brzo i točno određivanje zemljopisnog podrijetla kod uzorka čije zemljopisno podrijetlo nije poznato ili se mora dodatno potvrditi.
8. Utvrditi koja ispitana analitička metoda omogućava najtočnije određivanje zemljopisnog podrijetla maslinovog ulja.
9. Ispitati primjenjivost predikcijskog modela za zemljopisno područje na hrvatska maslinova ulja iz različitih godina proizvodnje i na maslinova ulja koja nisu iz Hrvatske.
10. Dobivene podatke objediniti u bazu zajedničkih značajki istarskog maslinovog ulja što će pridonijeti boljoj karakterizaciji tih ulja.
11. Ispitati utjecaj krivotvorenja ekstra djevičanskog maslinovog ulja s maslinovim uljima niže kategorije kvalitete ili drugim biljnim uljima na sastav triacilglicerola.
12. Ispitati mogućnost razine detekcije dodatka drugog ulja u maslinovo ulje kroz kemometrijsku obradu rezultata dobivenih MALDI-TOF tehnologijom.
13. Ispitati povezanost NIR spektra i osnovnih kemijskih parametara maslinovog ulja određenih pravilnikom propisanim metodama (slobodne masne kiseline, peroksidni broj, K_{232} i K_{270}).
14. Utvrditi da li je moguće i s kojom točnošću iz NIR spektra odrediti osnovne kemijske parametre maslinovih ulja hrvatskog podrijetla.
15. Ispitati povezanost NIR spektra i glavnih komponenta maslinovog ulja (MK i TAG) određenih visokoprotoknim analitičkim metodama masene spektrometrije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci

Uzorci maslinovih ulja s područja Republike Hrvatske sakupljeni su neposredno nakon proizvodnje izravno od proizvođača ili posredno preko maslinarskih udruga te u specijaliziranim trgovinama. Detaljan opis uzoraka nalazi se u tablici 3. Uzorci su prikupljeni tijekom sezona 2012./2013., 2013./2014., 2014./2015. i 2015./2016. U prvoj godini istraživanja prikupljeno je 19 uzoraka koji su se koristili za razvijanje MALDI-TOF/MS metode analize TAG, dok su se uzorci iz 2014./2015. i 2015./2016. koristili za sveukupnu karakterizaciju hrvatskih maslinovih ulja i ispitivanje analitičkih metoda u segmentu autentičnosti. Ukupno je prikupljeno 103 uzoraka. Prikupljeni uzorci su grupirani prema zemljopisnom području: Istra, Kvarner, Dalmacija.

Tablica 3. Opis uzoraka maslinovog ulja iz svih godina uzorkovanja

Oznaka uzorka	Opis uzorka			
	Regija	Godina	Broj uzoraka	Sorte maslina
Ia	Istra	2012	4	<i>Leccino, Buža, Istarska bjelica, miješane sorte</i>
Ib	Istra	2013	10	<i>Leccino, Buža, Istarska bjelica, miješane sorte</i>
Ic	Istra	2014	14	<i>Leccino, Buža, Istarska bjelica, Frantoio, miješane sorte</i>
Id	Istra	2015	30	<i>Leccino, Buža, Istarska bjelica, miješane sorte</i>
Ka	Kvarner	2012	4	<i>Oblica, Plominka, Simjaca</i>
Kb	Kvarner	2014	8	<i>Oblica, Plominka, miješane sorte</i>
Kc	Kvarner	2015	11	<i>Oblica, Plominka, Leccino, miješane sorte</i>
Da	Dalmacija	2012	1	<i>miješane sorte</i>
Db	Dalmacija	2014	2	<i>miješane sorte</i>
Dc	Dalmacija	2015	19	<i>Oblica, Leccino, miješane sorte</i>

Za ispitivanje primjenjivosti MALDI-TOF/MS metode za analizu triacilglicerola u različitim biljnim uljima korišteni su osim maslinovih ulja i uzorci sezamovog i suncokretovog ulja. Sezamovo i suncokretovo ulje dobiveni su hladnim prešanjem u tvornici Kleeschulte (Büren, Njemačka).

Za analizu krivotvorenja prikupljeni su uzorci jestivog suncokretovog ulja i maslinovog ulja niže kategorije kvalitete (maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja). Jestivo suncokretovo ulje proizvedeno je procesom rafinacije suncokretovog ulja u tvornici ulja Čepin d.o.o. (Čepin, Hrvatska). Maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja proizvedeno je u tvornici ulja Trenton d.o.o. (Gizdovac, Hrvatska) te sadrži 50 % rafiniranih maslinovih ulja i 50 % djevičanskih maslinovih ulja. Navedena ulja nabavljena su u maloprodaji. Ekstra djevičansko maslinovo ulje koje se koristilo za simulaciju krivotvorenja nabavljeno je izravno od proizvođača. Potječe iz Istarske regije, a dobiveno je isključivo mehaničkim postupkom hladnog prešanja iz plodova maslina različitih sorti, uz prevladavanje sorte *Leccino*. Za simulaciju krivotvorenja korištene su mješavine 1 %, 10 % i 20 % rafiniranog suncokretovog ulja i maslinovog ulja sastavljenog od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja u ekstra djevičansko maslinovo ulje. Detaljan opis uzoraka i pripadajuće oznake navedeni su u tablici 4.

Tablica 4. Opis uzoraka za analizu krivotvorenja ekstra djevičanskog maslinovog ulja

Oznaka uzorka	Opis uzorka
Id23	Ekstra djevičansko maslinovo ulje iz Istre
S	Jestivo suncokretovo ulje
S1	99 % ekstra djevičansko maslinovo ulje + 1 % suncokretovo ulje
S10	90 % ekstra djevičansko maslinovo ulje + 10 % suncokretovo ulje
S20	80 % ekstra djevičansko maslinovo ulje + 20 % suncokretovo ulje
R	Maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja
R1	99 % ekstra djevičansko maslinovo ulje + 1 % maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja
R10	90 % ekstra djevičansko maslinovo ulje + 10 % maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja
R20	80 % ekstra djevičansko maslinovo ulje + 20 % maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja

U proširenom istraživanju krivotvorenja uvedeno je dodatnih devet Id ekstra djevičanskih uzoraka (maslinova ulja iz Istre, sezone 2015.) te njihove 1 % mješavine sa S ili R .

3.1.2. Reagensi

Svi reagensi korišteni u ovom radu bili su analitičke čistoće i više ili spektrofotometrijske čistoće ako je to zahtijevala metoda. Fenolftalein, izooktan, kalij hidroksid, natrijev tiosulfat pentahidrat, kalij jodid, dietil eter i octena kiselina su nabavljeni od BDH Prolabo (Lutterworth, Ujedinjena Kraljevina). Škrob i kloroform su nabavljeni od Kemike (Zagreb, Croatia), dok je 96 % etanol nabavljen od Gram-mol (Zagreb, Hrvatska). Heksan i metanol su nabavljeni od VWR (West Chester, PA, SAD). Od Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, SAD) nabavljeni su natrijev trifluoracetat, 2,5-dihidrobenzoična kiselina (DHB), tetrahidrofuran (THF), trimetilsulfonijev hidroksid (TMSH) i standardi triolein, oleinska kiselina, protein bradikinin, angiotensin II i P14 R. Standard mješavina metil estera masnih kiselina FAME Mix C4 – C24 nabavljen je od Supelco (Bellefonte, PA, SAD).

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje osnovnih parametara kvalitete ulja

Određivanje osnovnih parametara kvalitete obuhvaća fizikalno-kemijske analize maslinovog ulja koje opisuju kvalitetu maslinovog ulja i koriste se za njegovu kategorizaciju.

3.2.1.1. Slobodne masne kiseline

Slobodne masne kiseline uzoraka ulja određene su standardnom metodom (European Commission, 1991) uz određene modifikacije. Udjel slobodnih masnih kiselina u maslinovom ulju govori o razini hidrolitičkog kvarenja, a priznat je kao standardni tržišni pokazatelj za dokazivanje kvarenja. Najprije se odvagalo 5 g uzoraka u Erlenmeyerovu tikvicu s točnosti od 0,01 g. Zatim se odvagani uzorak otopio u 50 mL prethodno neutraliziranoj smjesi dietil etera i etanola omjera 1:1 (v/v). U smjesu se kao indikator dodao fenolftalein, otopina koncentracije 10 g/L u 96 % etanolu (v/v). Tako pripremljena smjesa, tj. prisutne slobodne masne kiseline titrirane su s etanolnom

otopinom kalij hidroksida množinske koncentracije 0,1 mol/L. Iz utrošenog volumena kalij hidroksida pri kojem je došlo do promjene boje indikatora u ružičasto, izračunat je udio slobodnih masnih kiselina u uzorku. Provedeno je i mjerenje slijepe probe. Udio slobodnih masnih kiselina (kiselost) izražen je kao postotak oleinske kiseline, a izračunat je prema izrazu:

$$SMK \% = \frac{V \cdot c \cdot M}{10 \cdot m}$$

gdje su:

SMK %= Udio slobodnih masnih kiselina u uzorku, kao postotok oleinske kiseline;

V = volumen standardizirane otopine kalij hidroksida upotrijebljen pri titraciji, u mL;

c = točna koncentracija standardizirane otopine kalij hidroksida, u mol/l;

M = molarna masa, u g/mol, kiseline koja se koristi za izražavanje rezultata (oleinska = 282);

m = masa uzorka u g.

Rezultat su predstavljeni kao aritmetičke sredine dva određivanja.

3.2.1.2. Peroksidni broj

Peroksidni broj uzoraka ulja određen je standardnom metodom (European Commission, 1991) uz određene modifikacije. Peroksidni broj se izražava u miliekvivalentima (meq) aktivnog kisika po kilogramu, a govori o količini onih tvari u uzorku koje oksidiraju kalij jodid, tj. o količini nastalih hidroperoksida. Uzorak je odvagao uz točnost od 0,001 g masa uzorka prema očekivanom peroksidnom broju (tablica 5).

Tablica 5. Masa uzorka koja se uzima za analizu s obzirom na očekivani peroksidni broj.

Očekivani peroksidni broj	Masa uzorka
(meq O ₂ /kg)	(g)
0 do 12	5,0 do 2,0
12 do 20	2,0 do 1,2
20 do 30	1,2 do 0,8
30 do 50	0,8 do 0,5
50 do 90	0,5 do 0,3

Odvagani uzorak je otopljen u 10 mL kloroforma uz brzo miješanje, a nakon toga dodano je 15 mL ledene octene kiseline i 1 mL zasićene otopine kalij jodida. Otopina se miješala 1 minutu, a zatim je ostavljena 5 minuta u tami pri temperaturi 15-25 °C. Nakon tog perioda dodalo se 75 ml destilirane vode. Naposljetku, oslobođeni jod se titirao sa standardnom otopinom natrij tiosulfata (koncentracije 0,01 mol/L) uz snažno mućkanje, koristeći otopinu škroba kao indikator. Očitani su volumeni natrij tiosulfata pri kojem je došlo do obezbojenja otopine, a na temelju njega izračunata je vrijednost peroksidnog broja. Kao slijepa proba korištena je jednako pripremljena otopina koja u sebi nije sadržavala uzorak. Za svaki uzorak provedena su dva određivanja. Peroksidni broj izražen u miliekvivalentima aktivnog kisika po kilogramu izračunat je preko matematičke formule:

$$PV = \frac{V \cdot T \cdot 100}{m}$$

gdje je:

V = volumen standardizirane otopine natrij tiosulfata u mL, korigiran za vrijednost slijepe probe;

T = točna molarlost upotrijebljene otopine natrij tiosulfata;

m = masa uzorka u g.

Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina dva određivanja.

3.2.1.3. Spektrofotometrijska analiza u ultraljubičastom području

Spektrofotometrijska analiza u ultraljubičastom (UV) području provedena je prema standardnoj metodi (European Commission, 1991) uz određene modifikacije. Apsorbancije pri valnim duljinama 232, 264, 268, 270 i 272 nm javljaju se zbog prisutnosti konjugiranih dienskih i trienskih sustava koji su rezultat procesa kvarenja ulja, tj. procesa oksidacije i/ili procesa rafinacije. Vrijednosti apsorbancije izražavaju se kao specifična ekstinkcija 1%-tne otopine ulja u otapalu s duljinom puta od 1 cm ($E_{1\% 1\text{ cm}}$), a dogovorno se označavaju sa K (koeficijent ekstinkcije).

Metoda je provedena na svim uzorcima maslinovih ulja. Odvagane mase uzoraka ulja u odmjerenoj tikvici od 10 mL iznosile su 0,1 g uz točnost od 0,001 g. Za određivanje K_{232} vrijednosti pripremala se otopina manje koncentracije stoga je odvagana masa uzorka iznosila je 0,02 g. U svaki uzorak je dodan izooktan do konačnog volumena od 10 mL. Apsorbancija u UV području mjerena je na spektrofotometru (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD). Slijepu probu činio je izooktan bez uzorka. Spektrofotometrom su izmjerene apsorbancije pri određenim valnim duljinama, a zatim su izračunate K_{232} , K_{270} i ΔK vrijednosti. Specifična ekstinkcija pri valnim duljinama 232 i 270 nm se računa prema matematičkoj formuli:

$$K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{c \cdot s}$$

gdje su:

K_{λ} = specifična ekstinkcija pri valnoj duljini λ ;

E_{λ} = izmjerena ekstinkcija pri valnoj duljini λ ;

c = koncentracija otopine u g/100 mL;

s = duljina puta zrake izražena u cm.

Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina dva određivanja.

Također dodatni pokazatelj procesa oksidacije ili procesa rafinacije je odstupanje specifične ekstinkcije. Specifična ekstinkcija ΔK je apsolutna vrijednost izračunata na temelju sljedeće matematičke formule (European Commission, 1991):

$$\Delta K = K_m - \frac{K_{m-4} + K_{m+4}}{2}$$

gdje su:

K_m = specifična ekstinkcija pri valnoj duljini tj. valnoj duljini od 268 do 272 nm na kojoj je zabilježena najviša apsorbancija;

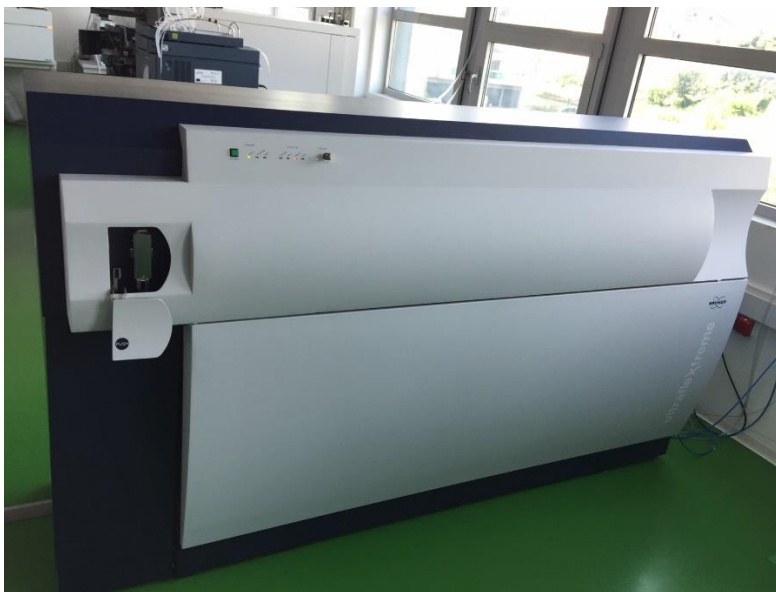
K_{m-4} = apsorbancijska vrijednost pri valnoj duljini koja je za 4 nm manja od valne duljinu na kojoj je zabilježena najviša apsorbancija;

K_{m+4} = apsorbancijska vrijednost pri valnoj duljini koja je za 4 nm veća od valne duljinu na kojoj je zabilježena najviša apsorbancija.

3.2.2. MALDI-TOF/MS analiza triacilglicerola

Za analizu triacilglicerola u ulju pripremljene su otopine matrice 2,5-dihidroksibenzoične kiseline (DHB), natrijevog trifluoracetata i uzorka ulja u koncentracijama od 40 mg/mL, 1 mg/mL i 10 μ L/mL, te zatim pomiješane u omjeru od 1:1:2 (v/v/v). Pripremljena mješavina nanosena je na MALDI pločicu, analiza je provedena na Bruker Ultraflextreme TOF masenom spektrometru (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) opremljenim sa tzv. „smartbeam“ II laserom s radnom duljinom vala pri 355 nm (slika 4). Za kalibraciju instrumenta korištena je mješavina standarda bradikinin, angiotenzin II i P14 R. MS spektri su snimljeni u pozitivnom reflektorskom načinu rada u m/z području od 240 do 2400. Ostali parametri instrumenta su frekvencija repeticije lasera na 2000 Hz, napon ionskog izvora 1 na 20 kV, napon ionskog izvora 2 na 17,9 kV te napon leće na 7,3 kV. Ukupni spektar pojedinog uzorka sastoji se od 6 spektara skupljenih na

različitim pozicijama „spota“ uzorka s time da se svaki spektar čini 500 laserskih pulseva. Prikupljeni spektri su bili obrađeni kako bi se uklonili mogući interferirajući signali bazne linije.



Slika 4. MALDI-TOF Ultraflextreme (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany)

3.2.2.1. MALDI-TOF/TOF MS strukturna analiza triacilglicerola

Uzorci ulja su otopljeni u tetrahidrofuranu (THF) u koncentraciji od 10 mL/mL (v/v). Također, matrica DHB i kationizacijski agens natrijev trifluoracetat su otopljeni u THF u koncentracijama od 10 mg/mL te 1 mg/mL. Otopljeni uzorak, matrica i kationizacijski agens pomiješani su u volumskom omjeru 1:2:1. Tako pripremljena mješavina u količini od 0,5 mL prenesena je na MALDI pločicu. Mjerenja su izvršena na JMS-S3000 SpiralTOF masenom spektrometru (JEOL Ltd, Akishima, Japan) opremljenim s Nd-YLF pulsirajućim laserom s radnom duljinom vala pri 349 nm (slika 5). Za određivanje osjetljivosti instrumenta korišten je standard 1-palmito-2-oleoil-3-linoleoilrac-glicerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). MS1 mjerenja su provedena u pozitivnom načinu rada s akceleracijskim potencijalom od 20 kV. Rezolucija snimljenih spektara u području triacilglicerola je bila 50–60 k FWHM (engl. *full width at half maximum*) uz ekstrakcijsku odgodu od 260 ns.



Slika 5. MALDI-TOF/MS JMS-S3000 SpiralTOF (JEOL Ltd, Japan) (Anonymus, 2017)

3.2.3. GC-MS analiza masnih kiselina

Za analizu masnih kiselina iz maslinovog ulja isprobane su dvije metode pripreme uzorka. Prva priprema uzorka napravljena je prema metodi COI/T.20/Doc. No. 33 (IOC, 2015). Izvagano je 0,1 g ulja te dodano 2 mL heksana, kratko vorteksirano i dodano 200 μ L metanolne otopine KOH koncentracije 2 mol/L. Snažno se miješalo 30 sekundi, zatim se centrifugiralo na 3000 rpm, 10 min pri 15 °C te se dobiveni gornji sloj sačuvao. Prije same analize 100 μ L pripremljenog uzorka razrijeđeno je s 1 mL heksana te profiltrirano kako bi se uklonile moguće nečistoće.

Druga metoda se sastojala od derivatizacije/ekstrakcijske tehnike u jednoj kivetu pri sobnoj temperaturi (Dron i sur., 2004). Uzorci ulja su otopljeni u kloroformu u omjeru ulje: kloroform 1:50, v/v. U kivetu je najprije pipetirano 80 μ L kloroforma i 10 μ L razrijeđenog uzorka te snažno pomiješano. Nakon toga je dodano 50 μ L otopine trimetilsulfonijeva hidroksida (TMSH) i lagano pomiješano.

Analiza je provedena na plinskom kromatografu GC 2010 Plus spregnutim s kvadrupolnim masenim spektrometrom GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Kyoto, Japan). Instrumentalna analiza provedena je nakon određivanja optimalnih uvjeta za temperaturni program kolone, temperaturu injektora, protok plina, količine injektiranog uzorka te brzinu snimanja spektra. Korištena je kapilarna kolona BPX70 dimenzija 30m x 0.25 mm s debljinom filma 0.25 μ m (SGE, Austin, TX, USA), čiji je temperaturni programa započeo pri 150 °C zadržavanjem zadane temperature 1 minutu, a zatim postepeno povećavao po 1°C /min sve do 180 °C kada je dostignuta temperatura zadržana 2 minute. Nakon toga je nastavljeno povećanje temperature razinom od 45 °C /min do 250 °C zadržavanje postignute temperature 10 minuta. Temperatura injektora bila je zadržana na 250 °C, a plin nosioc bio je helij s protokom od 0,85 mL/min. 1 μ L uzorka je injektirano s omjerom (tzv. „split“) 1:80. Spektri su snimljeni u području 45 do 400 m/z brzinom od 0,2 s/scan u vremenu od 3 min do 40 min.

Identifikacija i kvantifikacija pikova

Pikovi dobiveni analizom GC-MS su identificirani uz pomoć dobivene vrijednosti masa/naboj te dodatnom potvrdom uspoređujući vrijeme zadržavanja (retencijsko vrijeme) pojedinih metilnih estera masnih kiselina s vremenom zadržavanja metilnih estera iz standardne smjese 37 masnih kiselina FAME Mix. Za izračunavanje kvantitativnog sastava masnih kiselina izraženog preko postotnog udjela korištena je metoda normalizacije površina, odnosno, pretpostavlja se da zbroj površina pikova koji odgovaraju metil esterima masnih kiselina iznosi 100 %. Površina pojedinog pika metil estera masne kiseline podijeljena je sa ukupnom površinom pikova koji pripadaju metil esterima masnih kiselina.

3.2.4. NIRS

NIR spektri maslinovih ulja snimljeni su na uređaju NIRS XDS RapidLiquid Analyze (Metrohm, Herisau, Switzerland). Prije analize uzorci ulja su centrifugirani 30 minuta pri brzini 7000 rpm te prebačeni u staklene kivete. Spektri su prikupljeni pri sobnoj temperaturi u području od 400 do 2500 nm. Pojedini spektar činile su 32 snimke. Izmjereni podaci su organizirani u matricu X s

uzorcima postavljenim u redovima i NIR spektrima smještenim u stupcima kako bi se provela daljnja statistička obrada. Prije same kemometrijske analize spektri su dodatno obrađeni kako bih se uklonili mogući interferirajući dijelovi spektra. U tu svrhu testirana i uspoređena su tri predtretmana: prva derivacija, druga derivacija po Savitzky-Golay metodi (7 „smoothing“ točka, polinomom višeg stupnja) i standardna normalna varijabla SNV (od engl. *standard normal variate*) (Barbin i sur., 2014; Bevilacqua i sur., 2012). Odabir predtretmana nije bio isti, već se primijenio onaj koji je dao najbolje rezultate u analizi. Za kemometrijsku analizu testirana su i različita spektralna područja, a najinformativnije se pokazalo NIR područje od 1000 do 2222 nm.

3.3. Statistička analiza

Statistička analiza dobivenih rezultata instrumentalne analize provedena je u programima Microsoft Excel 2013 (Microsoft, 2013), UNSCRAMBLER verzija 10.4 (CAMO, Trondheim, Norway, 2016) i Statistica verzija 12 (Dell, 2015). U statističkoj obradi rezultata koristile su se sljedeće metode: analiza varijanci (ANOVA), PCA, PLS i PLS-DA.

3.3.1. ANOVA

Analiza varijanci (ANOVA) je standardna statistička metoda usporedbe tri i više skupina podataka temeljem analize varijabilnosti unutar skupina (Miller, 1986). U ovom je istraživanju standardna ANOVA provedena kako bi se utvrdilo jesu li udjeli triacilglicerola u različitim kategorijama ulja statistički značajno različiti.

3.3.2. PCA

Metoda glavnih komponenti (PCA , od engl. *principal component analysis*) provedena je kako bi se reducirao broj zavisnih varijabli te kako bi se uočile razlike u sastavu uzoraka ulja s obzirom na zemljopisno područje. PCA omogućava pojednostavljeni dvodimenzionalni prikaz podataka stvaranjem zajedničkih dimenzija uzduž kojih se klasificiraju varijable. Na temelju tih varijabli uzorci se prikazuju u stvorenom koordinatnom sustavu zajedničkih dimenzija nazvanih glavnim komponentama (PC, od engl. *principal components*). Prva PC opisuje najveću varijabilnost, dok se kod svake sljedeće smanjuje njihov prinos ukupnoj varijanci. Krajnji rezultat PCA je grafikon

koji omogućava jednostavno uočavanje grupiranja, odnosno razlika i sličnosti između analiziranih uzorka (Jolliffe, 2002).

3.3.3. PLS

Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS) korištena je kako bi se ispitala kovarijanca između mnogobrojnih skupova varijabli. PLS se zasniva na višestrukoj regresiji i analizi faktora, a može uključivati veliki skup nezavisnih varijabli uz istovremeno modeliranje nekoliko zavisnih varijabli (Serbetar, 2012; Wold i sur., 2001). Analiza se sastoji od dva koraka, odnosno izrade kalibracijskog modela te testiranja izrađenog modela. U izradi kalibracijskog modela moraju se uključiti svi mjereni parametri koji će se kasnije koristiti za predikciju. Testiranja izrađenog kalibracijskog modela, tj. predikcija izvodi se s novim uzorcima koji nisu uključeni u kalibracijski model. Uspješnost modela procjenjuje se usporedbom predviđenih vrijednost s referentnim vrijednostima (Wold i sur., 2001). Stoga su se za procjenu kvalitete i prediktivne snage modela pratili koeficijent determinacije R^2c , križno validacijski koeficijent determinacije R^2cv , korijen srednje kvadratne pogreške kalibracije RMSEC te korijen srednje kvadratne pogreške križne validacije RMSECV. Dodatno, u određivanju sadržaja masnih kiselina i triacilglicerola promatrala se i relativna pogreška križne validacije (RECV%) koja se dobiva dijeljenjem RMSECV s prosječnom koncentracijom promatranog parametra (Olivieri i sur., 2004). U predikciji osnovnih parametara kvalitete kod maslinovih ulja iz vanjskog validacijskog seta promatrali su se korijen srednje kvadratne pogreške predikcije RMSEP, koeficijent determinacije za predikciju R^2p te vrijednost „residual predictive deviation“ RPD koja se definira kao omjer između standardne devijacije i RMSEP. RPD govori o pouzdanosti i kvaliteti regresijskog modela (Salguero-Chaparro i Peña-Rodríguez, 2014). Vrijednost RPD manja od 1,4 ukazuje da model nije reprezentativan za predikciju, ako je RPD između 1,4 i 2,0 smatra se da je predikcija prihvatljiva, a RPD veći od 2,0 ukazuje na odličnu predikciju (Cozzolino i Morón, 2006).

3.3.4. PLS-DA

Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata - diskriminanta analiza (PLS-DA) je nadogradnja PLS analize uz dodatnu mogućnost predviđanja kategoričkih odgovora. Naime, PLS-DA pruža

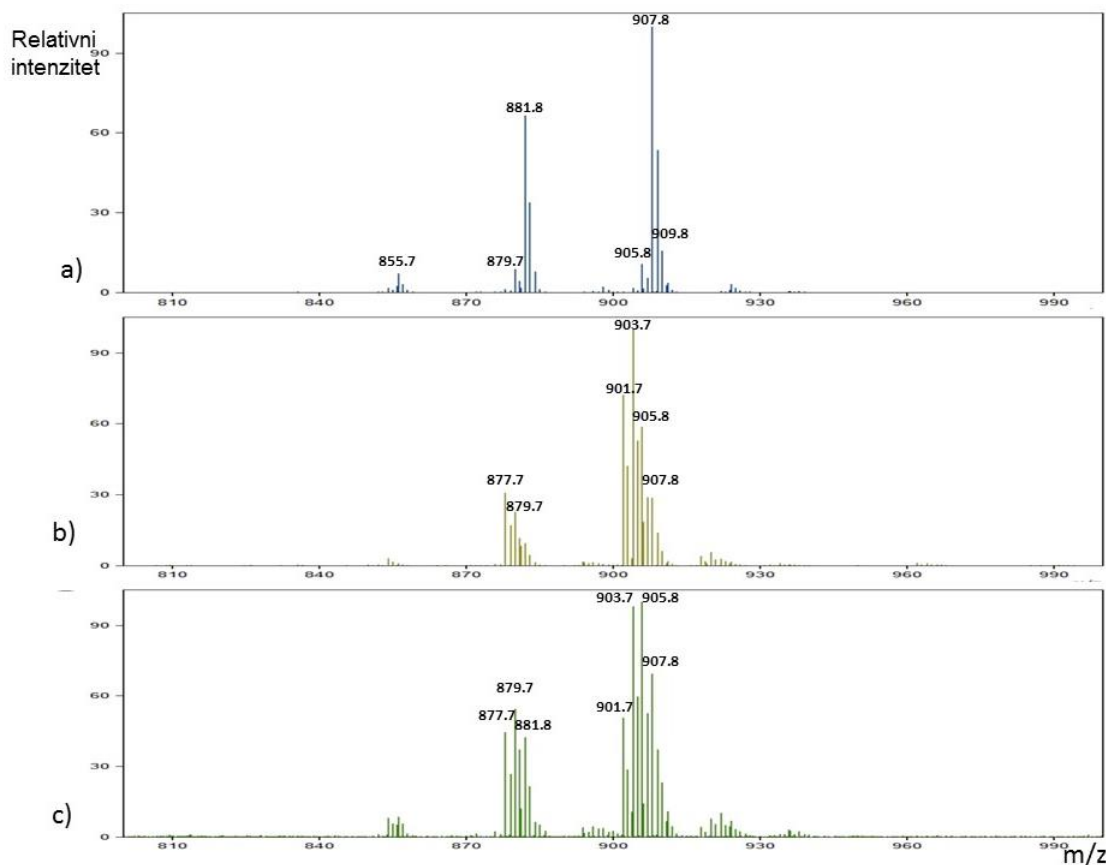
informaciju da li uzorak pripada određenoj kategoriji i to u kojoj mjeri (Brereton i Lloyd, 2014). Stoga je za određivanje zemljopisne pripadnosti maslinovog ulja korištena ova statistička analiza. Uzorci su grupirani u 2 grupe koristeći binarni sustav, tj. uzorci su kodirani s 1 ili 0 u ovisnosti da li pripadaju ili ne pripadaju grupi. U predikciji se odluka da li uzorak pripada određenoj grupi temeljila na graničnoj vrijednosti 0,5. Napravljeno je nekoliko PLS-DA modela uzimajući u obzir različiti set varijabli. Naime, kao nezavisne varijable korištene su varijable „sastav triacilglicerola“, „sastav masnih kiselina“ ili „NIR spektar“. Također, kod NIR spektra napravljen je odabir najvažnijih valnih duljina kako bi se smanjio broj varijabli koje ne pridonose klasifikaciji prema zemljopisnom području. Odabir varijabli se temeljio na značajnosti varijabla određenoj preko regresijskog koeficijenta.

4. REZULTATI

U ovom poglavlju prikazani su rezultati MALDI-TOF/MS, GC-MS, NIR spektroskopskih i statističkih analiza provedenih u svrhu istraživanja autentičnosti uzoraka maslinovog ulja s hrvatskog tržišta. Uz to prikazani su i rezultati klasifikacije ispitanih uzorka maslinovog ulja.

4.1. Analiza triacilglicerola u uljima

Analiza triacilglicerola provedena je u različitim biljnim uljima (slika 6). Njihova opća nomenklatura na temelju usporedbe teorijskih i eksperimentalnih m/z vrijednosti prikazana je u tablici 6. Osim kvalitativne analize TAG provedena je i kvantitativna analiza zahvaljujući homogenoj mješavini uzorka i matrice vidljivoj na slici 7.



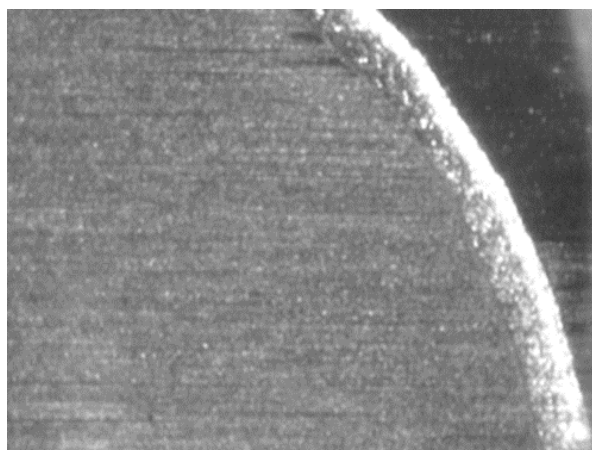
Slika 6. Usporedba profila TAG u MALDI-TOF spektru dobivenog za a) uzorak maslinovog ulja, b) suncokretovog ulja i c) sezamovog ulja (Peršurić i sur., 2017).

Tabla 6. Opća nomenklatura TAG dobivenih MALDI-MS analizom maslinovog ulja na temelju usporedbe eksperimentalno dobivenih i teorijski izračunatih m/z vrijednosti.

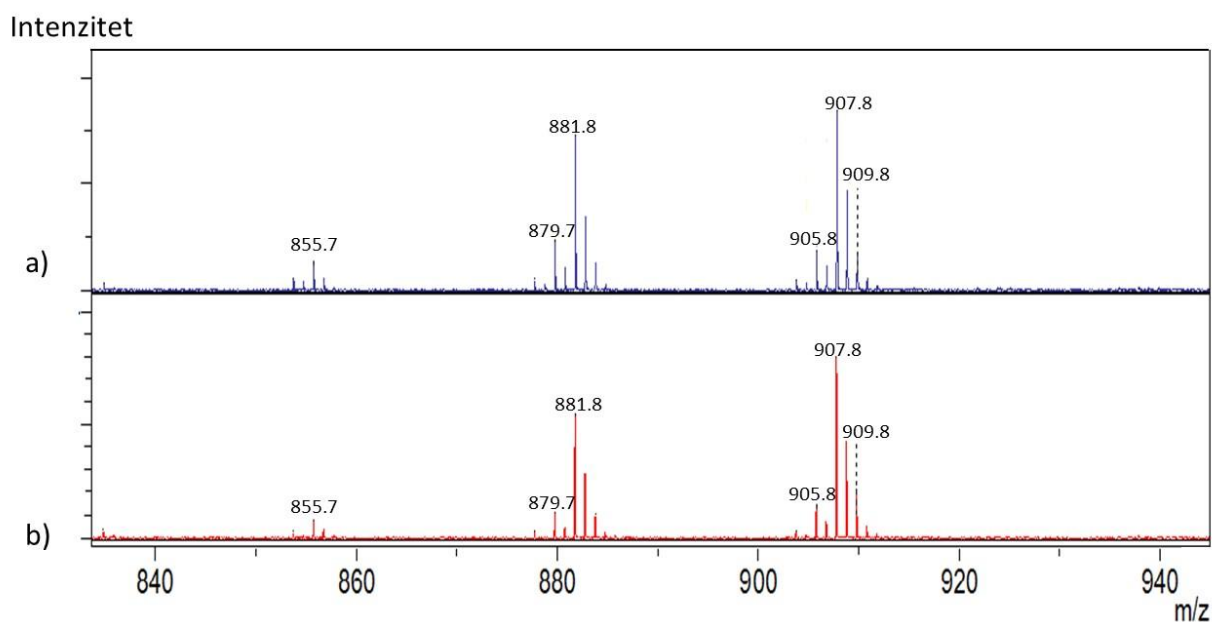
Eksperimentalna vrijednost m/z^a	Izračunata vrijednost m/z^a	Broj ugljika: Broj dvostrukih veza	TAG^b
853.72	853.73	C53: 2	PLP
855.74	855.74	C53:1	POP
875.70	875.70	C55:5	PLLn
877.72	877.73	C55:4	PLL/POLn
879.74	879.74	C55:3	POL
881.75	881.76	C55:2	POO
883.76	883.77	C55:1	POS
901.72	901.73	C57:6	LLL
903.74	903.74	C57:5	LLO/LOL
905.75	905.76	C57:4	LOO
907.77	907.77	C57:3	OOO
909.78	909.79	C57:2	SOO
911.79	911.80	C57:1	SOS

^a m/z vrijednosti kao natrijevi adukti

^b P palmitinska kiselina, S stearinska kiselina, O oleinska kiselina, L linolna kiselina, Ln linolenska kiselina



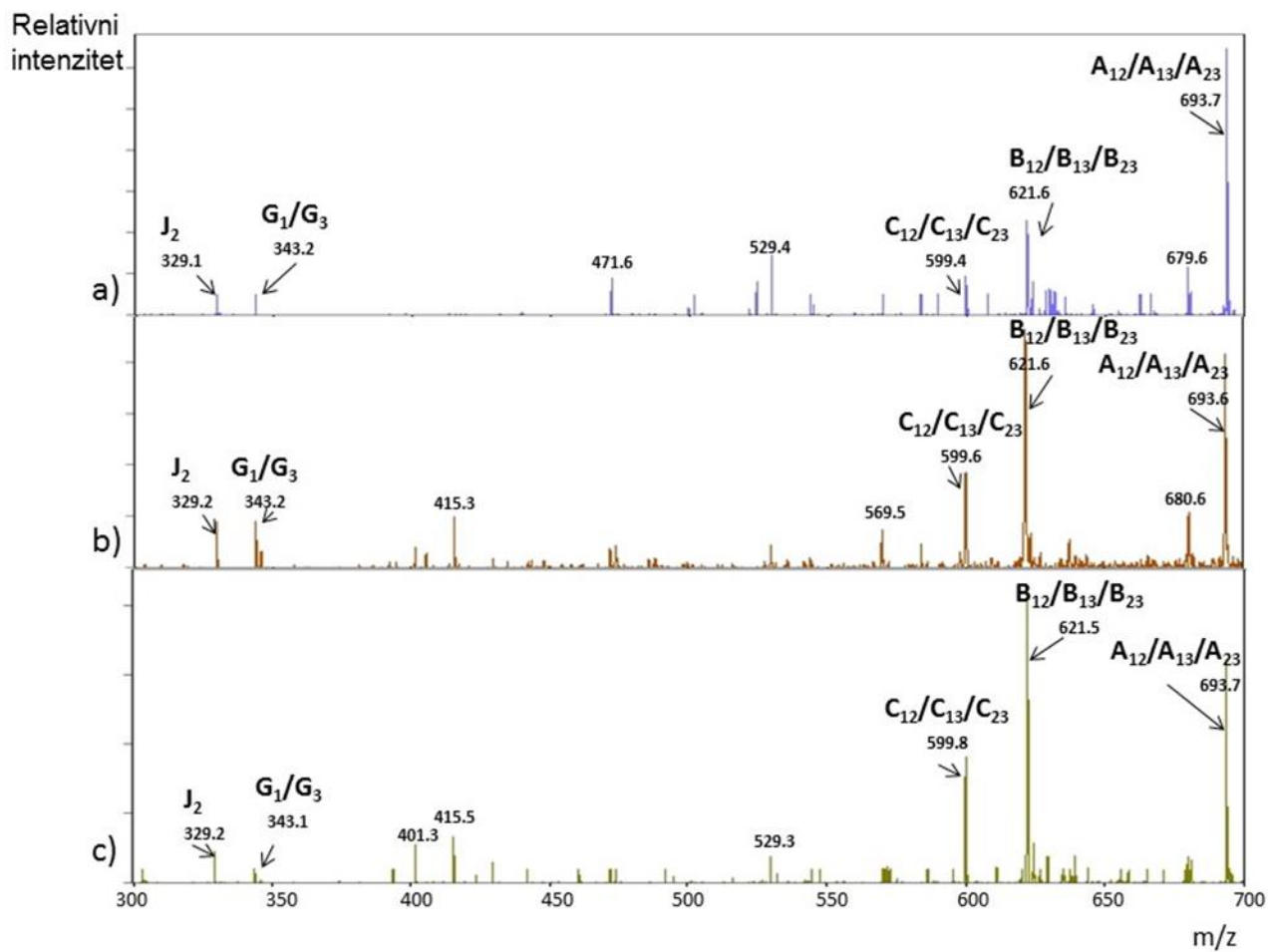
Slika 7. Uvećani prikaz mješavine uzorka i matrice nanese na MALDI pločicu „spot“.



Slika 8. Usporedba MALDI-TOF spektara u području triacilglicerola dobivenog za a) maslinovog ulja s Kvarnera i b) maslinovo ulje iz Istre.

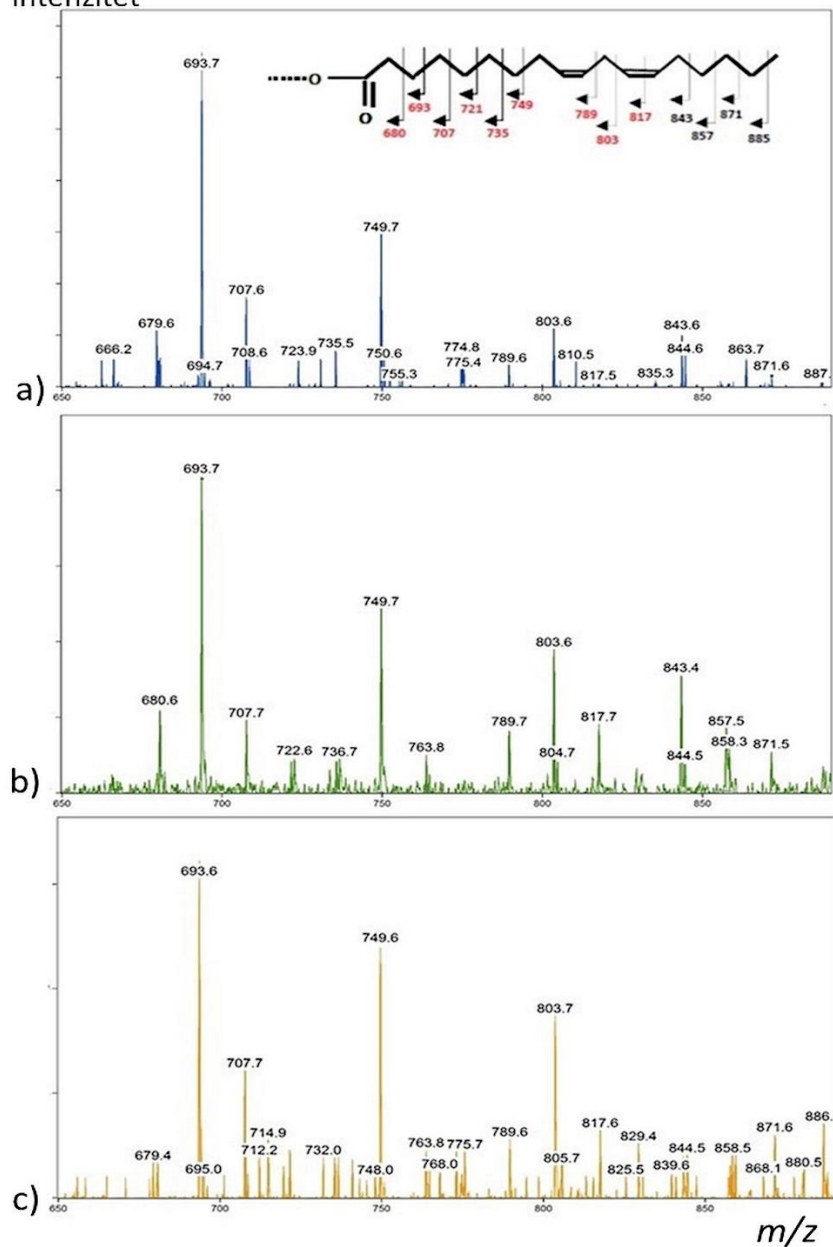
4.1.1. Potpuna strukturna karakterizacija triacilglicerola

Potpuna strukturna karakterizacija odabranih triacilglicerola iz različitih biljnih ulja uz pomoću CID na instrumentu MALDI-spiralTOF/TOF prikazana je na slikama 9-13.

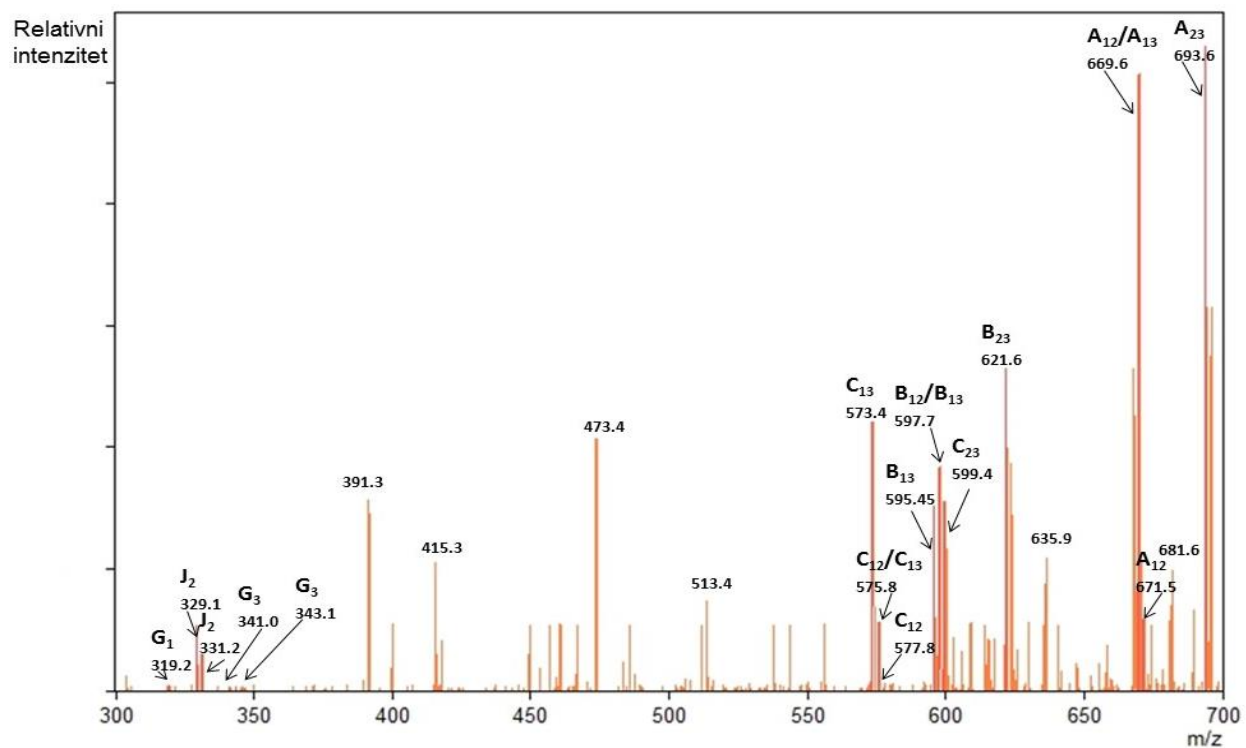


Slika 9. Produkt ioni nastali fragmentacijom iona 901.7 kod uzorka a) maslinovog ulja s Kvarnera sorte *Oblica*, b) suncokretovog ulja i c) sezamovog ulja. Analizom A-, B-, C-, G- i J- tipa iona može se zaključiti da je kod svih uzoraka m/z 901.7 triacilglicerol s tri linoleoil ostataka (Peršurić i sur., 2017).

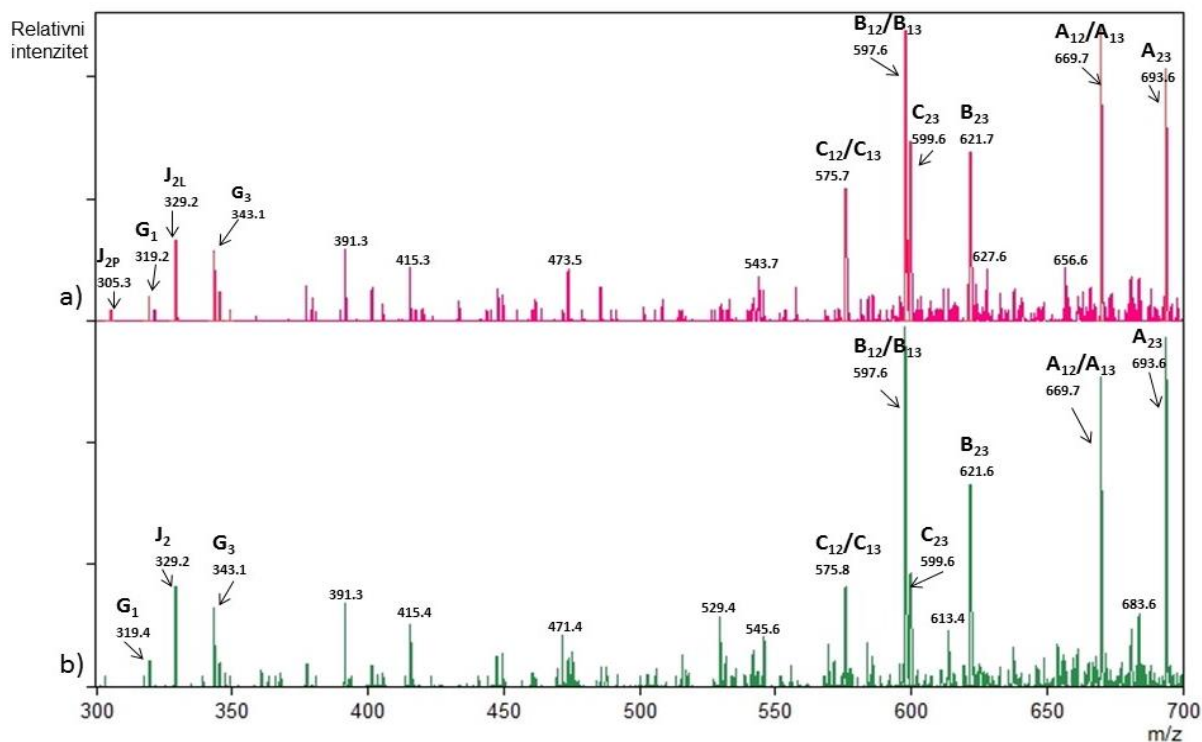
Relativni
intenzitet



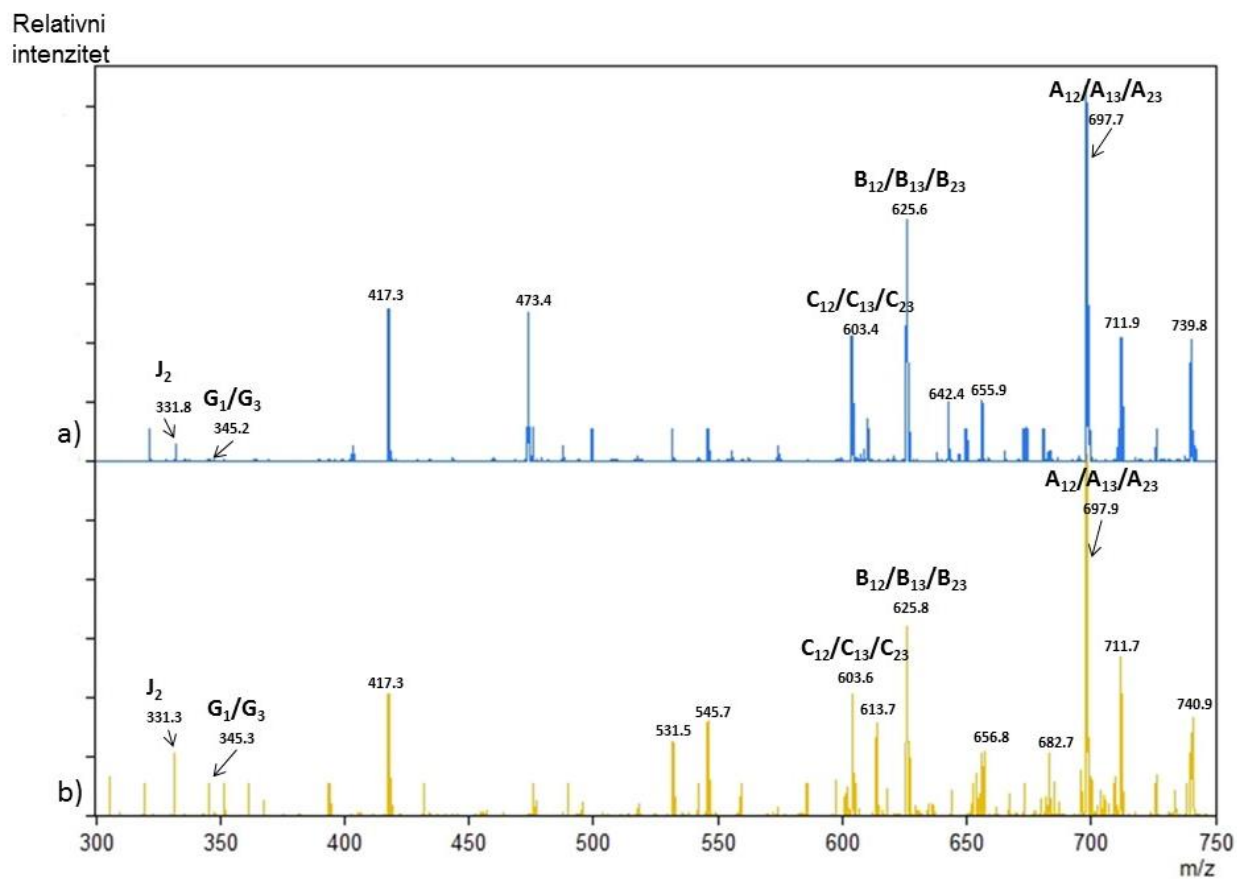
Slika 10. Spektri produkt iona nastalih fragmentacijom prekursorskog iona 901.7 m/z u analizi : a) maslinovog ulja s Kvarnera, sorte *Oblica*, b) suncokretovog ulja c) sezamovog ulja. Područje spektra od 650 do 890 m/z indikativno je za određivanje pozicije dvostruke veze unutar masno kiselinskih ostataka zahvaljujući tzv. „charge-remote“ fragmentaciji (Peršurić i sur., 2017).



Slika 11. Produkt ioni nastali fragmentacijom iona m/z 877.7 u uzorku maslinovog ulja sorte *Simjaca* s Kvarnerskog područja. Prema karakterističnim ionima može se zaključiti da ion m/z 877.7 čine dva triacilglicerola PLL i POLn (Peršurić i sur., 2017).



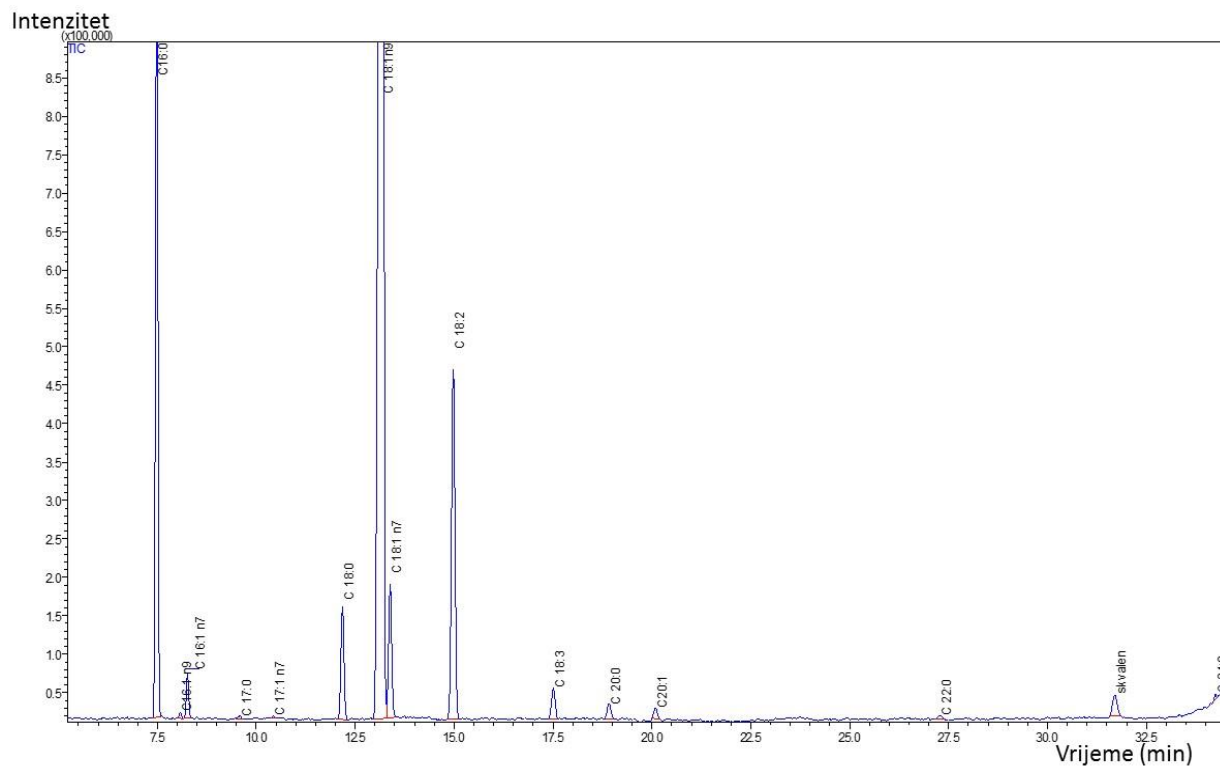
Slika 12. Produkt ioni nastali kao fragmentacijom iona m/z 877.7 u uzorcima a) suncokretovog ulja i b) sezamovog ulja. Točna strukturna identifikacija prema karakterističnim ionima pokazala je da kod suncokretovog ulja ion m/z 877.7 čine pozicijski izomeri PLL i LPL, dok je kod sezamovog ulja prisutan samo PLL (Peršurić i sur., 2017).



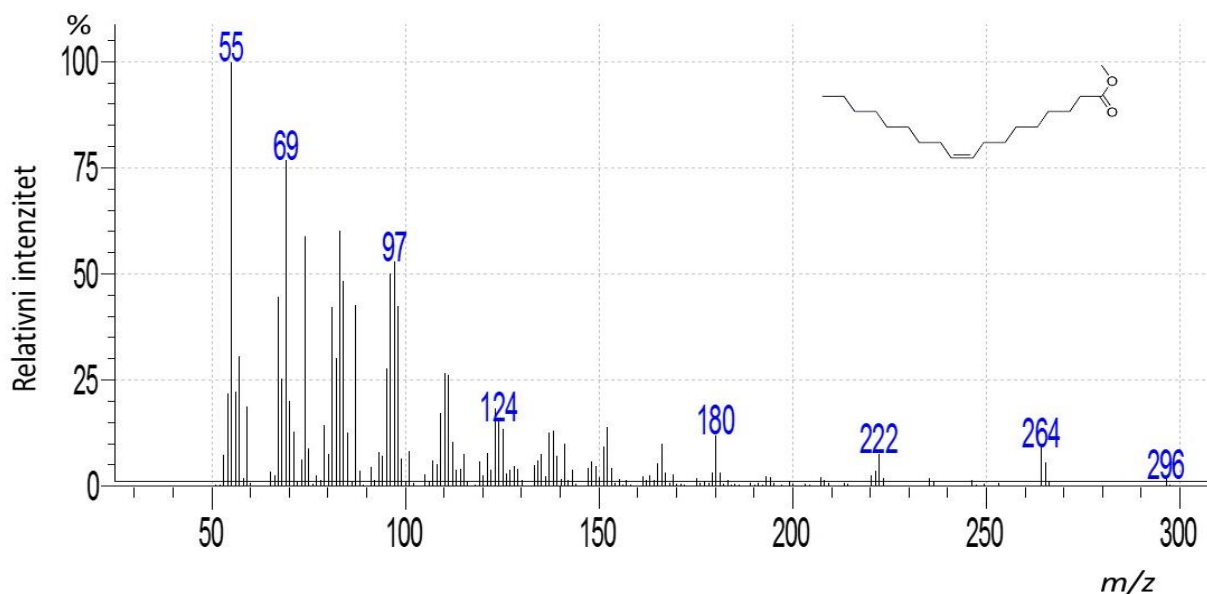
Slika 13. Spektri s produkt ionima nastalim fragmentacijom iona m/z 907.8 u uzorcima istarskih maslinovih ulja a) sorte *Buža* i b) sorte *Istarska bjelica*. Kod oba uzorka maslinovog ulja ion m/z 907.8 je TAG OOO (Peršurić i sur., 2017)

4.2. Analiza masnih kiselina u uljima

Analiza masnih kiselina u uljima izvršena je uz pomoć instrumenta GC-MS. Iz ukupnog ionskog kromatograma omogućena je identifikacija pojedinih metil estera na temelju njihovog retencijskog vremena (slika 14), a dodatna potvrda identifikacije provedena je analizom masenog spektra (slika 15).



Slika 14. Ukupni ionski kromatogram dobiven analizom metil estera masnih kiselina u maslinovom ulju iz Istre.



Slika 15. Maseni spektar oleinske kiseline.

4.3. Analiza hrvatskih maslinovih ulja

4.3.1. Osnovni parametri kvalitete i sastav glavnih komponenta hrvatskih maslinovih ulja iz 2014. godine

Kriteriji kojima se dokazala kategorija maslinovih ulja iz 2014. godine su: udio slobodnih masnih kiselina izražen kao postotak oleinske kiseline, peroksidni broj (PV) izražen u meq O_2 /kg ulja, te K vrijednosti. Dobivene vrijednosti prikazane su u tablici 7. Sastav i udio masnih kiselina u tim uljima prikazan je u tablici 8, dok je sastav i udio triacilglicerola prikazan u tablici 9.

Tablica 7. Osnovni parametri kvalitete svih hrvatskih maslinovih ulja iz 2014.

Uzorak	Regija	Kategorija ^a	Slobodne masne kiseline (% oleinske kiseline)	Peroksidni broj (meq O ₂ /kg ulja)	K232	K270	ΔK
Ic1	Istra	DMU	1,14	11,25	2,11	0,20	0,001
Ic2	Istra	EDMU	0,38	13,29	1,90	0,13	0,000
Ic3	Istra	EDMU	0,46	15,95	2,02	0,14	0,001
Ic4	Istra	EDMU	0,45	8,00	2,05	0,13	0,002
Ic5	Istra	EDMU	0,37	5,00	1,99	0,12	0,002
Ic6	Istra	EDMU	0,51	14,99	2,18	0,13	0,001
Ic7	Istra	EDMU	0,31	9,96	1,94	0,08	0,001
Ic8	Istra	EDMU	0,59	12,49	2,09	0,13	0,002
Ic9	Istra	MUL	0,68	11,66	2,73	0,14	0,001
Ic10	Istra	MUL	0,28	19,00	3,20	0,22	0,000
Ic11	Istra	EDMU	0,34	16,57	1,79	0,18	0,001
Ic12	Istra	EDMU	0,39	4,98	1,71	0,11	0,002
Ic13	Istra	EDMU	0,35	11,65	1,71	0,12	0,001
Ic14	Istra	EDMU	0,62	9,99	2,18	0,12	0,001
Kb1	Kvarner	MUL	2,10	21,91	2,90	0,20	0,003
Kb2	Kvarner	MUL	4,78	32,93	2,78	0,34	0,006
Kb3	Kvarner	MUL	5,20	26,94	3,23	0,33	0,007
Kb4	Kvarner	MUL	5,13	33,66	3,15	0,43	0,012
Kb5	Kvarner	MUL	5,35	27,97	3,24	0,32	0,007
Kb6	Kvarner	MUL	3,52	29,90	3,86	0,31	0,007
Kb7	Kvarner	MUL	4,93	26,89	3,62	0,38	0,008
Kb8	Kvarner	DMU	1,25	8,75	1,97	0,20	0,000
Db1	Dalmacija	EDMU	0,54	14,00	2,23	0,18	0,002
Db2	Dalmacija	MUL	0,65	16,00	2,62	0,23	0,002

^aEDMU ekstra djevičansko maslinovo ulje, DMU djevičansko maslinovo ulje, MUL maslinovo ulje lampante.

Tablica 8. Sastav i udio masnih kiselina maslinovih ulja iz Hrvatske s godinom proizvodnje 2014.

Uzo rak	C16:0 (%)	C16:1n 9 (%)	C16:1n 7 (%)	C17:1 (%)	C18:0 (%)	C18:1n 9 (%)	C18:1n 7 (%)	C18:2 (%)	C18:3 (%)	C20:0 (%)	C20:1 (%)	C22:0 (%)
Ic1	12,54	0,07	0,85	0,08	1,94	75,47	3,18	5,09	0,42	0,16	0,18	0,03
Ic2	11,58	0,09	0,74	0,06	1,59	77,78	2,85	4,53	0,46	0,15	0,17	0,02
Ic3	14,11	0,05	0,67	0,06	1,56	75,20	2,71	5,07	0,31	0,12	0,12	0,02
Ic4	15,82	0,05	0,83	0,03	1,67	73,75	2,85	4,47	0,34	0,10	0,10	0,00
Ic5	10,62	0,04	0,45	0,04	1,63	77,92	2,04	6,68	0,35	0,08	0,15	0,00
Ic6	13,04	0,05	0,77	0,09	1,65	75,93	2,87	4,91	0,43	0,14	0,12	0,00
Ic7	13,58	0,05	0,83	0,04	1,45	76,84	2,77	3,81	0,36	0,11	0,15	0,00
Ic8	12,82	0,04	0,90	0,09	1,39	75,88	2,97	5,26	0,38	0,15	0,13	0,00
Ic9	13,78	0,05	0,86	0,08	1,88	72,34	2,54	7,81	0,41	0,13	0,12	0,00
Ic10	10,38	0,05	0,65	0,08	1,40	77,60	2,46	6,64	0,39	0,19	0,13	0,01
Ic11	11,64	0,05	0,70	0,07	1,43	78,83	2,55	4,09	0,37	0,17	0,11	0,00
Ic12	11,28	0,03	0,75	0,03	1,37	78,79	2,70	4,36	0,41	0,14	0,13	0,00
Ic13	10,96	0,05	0,77	0,04	1,42	79,44	2,66	3,97	0,39	0,14	0,16	0,00
Ic14	11,55	0,05	0,95	0,05	1,43	78,19	2,97	4,23	0,31	0,14	0,13	0,00
Kb1	12,72	0,05	0,66	0,04	1,35	74,50	2,50	7,40	0,48	0,17	0,11	0,03
Kb2	10,38	0,03	0,54	0,05	1,72	75,07	2,28	8,98	0,63	0,16	0,15	0,00
Kb3	8,82	0,06	0,48	0,03	1,54	75,45	2,32	10,28	0,61	0,22	0,18	0,00
Kb4	12,92	0,04	0,53	0,07	1,61	73,58	2,23	7,95	0,67	0,24	0,17	0,00
Kb5	12,10	0,05	0,48	0,04	1,83	72,20	2,11	10,38	0,47	0,20	0,14	0,00
Kb6	12,81	0,04	0,45	0,03	1,68	73,30	2,18	8,57	0,55	0,19	0,17	0,02
Kb7	9,51	0,04	0,50	0,07	1,57	75,96	2,38	8,95	0,66	0,14	0,17	0,03
Kb8	16,90	0,05	1,40	0,04	1,67	68,81	3,52	6,70	0,61	0,16	0,15	0,00
Db1	8,21	0,07	0,45	0,07	2,47	81,21	1,82	5,07	0,38	0,19	0,06	0,00
Db2	8,99	0,06	0,43	0,08	2,10	76,81	1,88	8,72	0,36	0,32	0,19	0,05

Tablica 9. Sastav i udio triacilglicerola maslinovih ulja iz Hrvatske s godinom proizvodnje 2014.

Uzorak	853.7 (%)	855.7 (%)	877.7 (%)	879.7 (%)	881.8 (%)	883.8 (%)	901.7 (%)	903.7 (%)	905.8 (%)	907.8 (%)	909.8 (%)
Ic1	1,64	4,85	1,13	5,51	32,78	0,00	0,00	1,42	6,00	37,00	9,67
Ic2	0,92	4,69	1,07	5,24	32,06	1,84	0,00	1,42	6,35	42,94	3,47
Ic3	1,39	4,83	1,02	5,42	32,25	1,93	0,00	1,59	7,08	40,37	4,12
Ic4	1,51	6,04	1,00	6,24	33,10	0,00	0,00	1,26	6,21	40,93	3,70
Ic5	1,14	4,22	1,03	6,06	29,51	0,00	0,00	2,02	9,46	42,05	4,51
Ic6	1,32	5,40	0,98	5,16	33,86	0,00	0,00	1,42	7,49	41,42	2,95
Ic7	2,10	7,38	0,89	5,69	38,62	0,00	0,00	1,10	4,87	36,71	2,64
Ic8	1,99	6,35	1,08	6,65	36,11	0,00	0,00	1,57	6,27	36,82	3,17
Ic9	1,78	4,51	1,66	8,23	28,50	1,40	0,42	2,52	10,70	35,95	4,32
Ic10	1,81	4,02	1,28	7,06	25,52	1,78	0,00	2,35	9,90	42,07	4,21
Ic11	1,87	6,79	1,20	5,62	34,13	2,02	0,00	1,24	5,64	37,89	3,61
Ic12	1,59	5,55	1,10	5,55	36,14	2,21	0,00	1,32	5,53	36,88	4,13
Ic13	1,35	3,69	1,12	5,80	28,58	0,00	0,00	1,58	6,87	45,48	5,54
Ic14	1,85	4,76	0,98	6,45	28,49	0,00	0,00	1,20	6,26	45,23	4,77
Kb1	1,80	5,18	1,53	7,85	29,48	0,00	0,00	2,28	10,42	37,46	4,00
Kb2	1,38	3,94	1,67	7,27	27,69	1,15	0,00	3,46	11,40	37,55	4,50
Kb3	1,43	4,09	1,77	8,41	25,19	0,00	0,68	3,39	13,38	37,49	4,17
Kb4	1,43	4,68	1,73	7,21	26,48	0,00	0,00	3,43	11,62	39,94	3,48
Kb5	1,36	3,21	2,03	8,83	23,55	1,33	0,69	3,69	14,52	36,56	4,23
Kb6	1,34	3,64	1,78	7,86	24,98	1,65	0,00	2,96	12,98	39,32	3,49
Kb7	1,29	3,54	1,92	7,96	25,09	2,01	0,00	3,27	11,84	38,57	4,51
Kb8	2,38	5,75	2,27	9,64	31,89	0,00	0,54	2,66	9,23	32,79	2,85
Db1	0,84	2,41	0,98	5,27	24,12	0,90	0,00	1,98	7,84	49,16	6,51
Db2	1,26	4,57	1,25	7,49	23,93	3,13	0,00	2,37	11,45	39,04	5,50

4.3.2. Osnovni parametri kvalitete i sastav glavnih komponenti hrvatskih maslinovih ulja iz 2015. godine

Kriteriji kojima se dokazala kategorija maslinovih ulja iz 2015. godine su: udio slobodnih masnih kiselina izražen kao postotak oleinske kiseline, peroksidni broj (PV) izražen u meq O₂/kg ulja, te K vrijednosti. Dobivene vrijednosti prikazane su u tablici 10. Sastav i udio masnih kiselina i triacilglicerola izabranih ekstra djevičanskih maslinovih ulja iz te godine prikazan je u tablici 11.

Tablica 10. Osnovni parametri kvalitete svih (n=60) hrvatskih maslinovih ulja iz 2015. godine.

Regija	Broj uzoraka	Kategorija ^a	Slobodne masne kiseline (% oleinske kiseline)		Peroksidni broj (meq O ₂ /kg ulja)		K232		K270		ΔK	
			SV ^b	SD ^c	SV ^b	SD ^c	SV ^b	SD ^c	SV ^b	SD ^c	SV ^b	SD ^c
Istra	30	EDMU	0,28	0,06	3,85	2,82	1,87	0,17	0,12	0,01	0,004	0,001
Kvarner	8	EDMU	0,34	0,10	5,36	2,86	2,00	0,23	0,12	0,03	0,002	0,001
Kvarner	2	DMU	1,48	0,65	1,87	0,87	1,71	0,27	0,13	0,02	0,001	0,001
Kvarner	1	MUL	0,65	-	13,37	-	3,48	-	0,17	-	0,001	-
Dalmacija	14	EDMU	0,31	0,14	5,52	2,71	1,98	0,28	0,12	0,02	0,002	0,001
Dalmacija	2	DMU	1,34	0,16	3,11	4,40	1,76	0,25	0,11	0,01	0,0003	0,0003
Dalmacija	3	MUL	1,19	0,93	17,27	2,74	3,18	0,43	0,19	0,03	0,003	0,002

^aEDMU ekstra djevičansko maslinovo ulje, DMU djevičansko maslinovo ulje, MUL maslinovo ulje lampante

^bSV srednja vrijednost

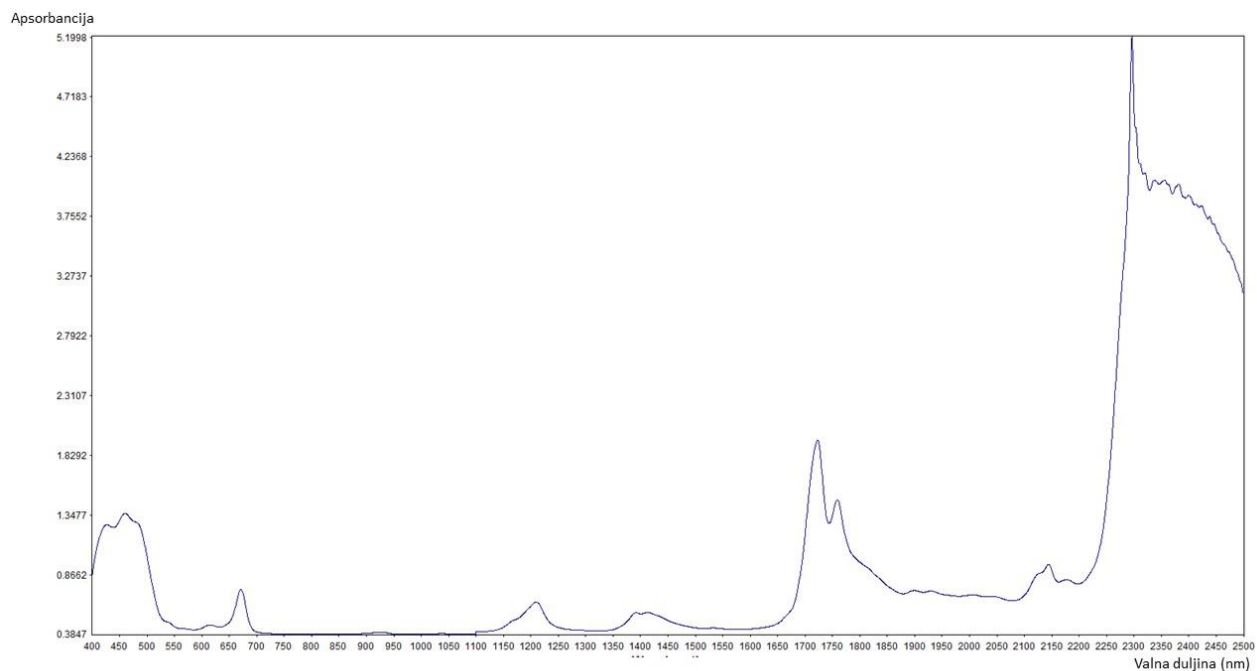
^cSD standardna devijacija

Tablica 11. Sastav i udio masnih kiselina i triacilglicerola ekstra djevičanskih maslinovih ulja iz Hrvatske (n=41) s godinom proizvodnje 2015.

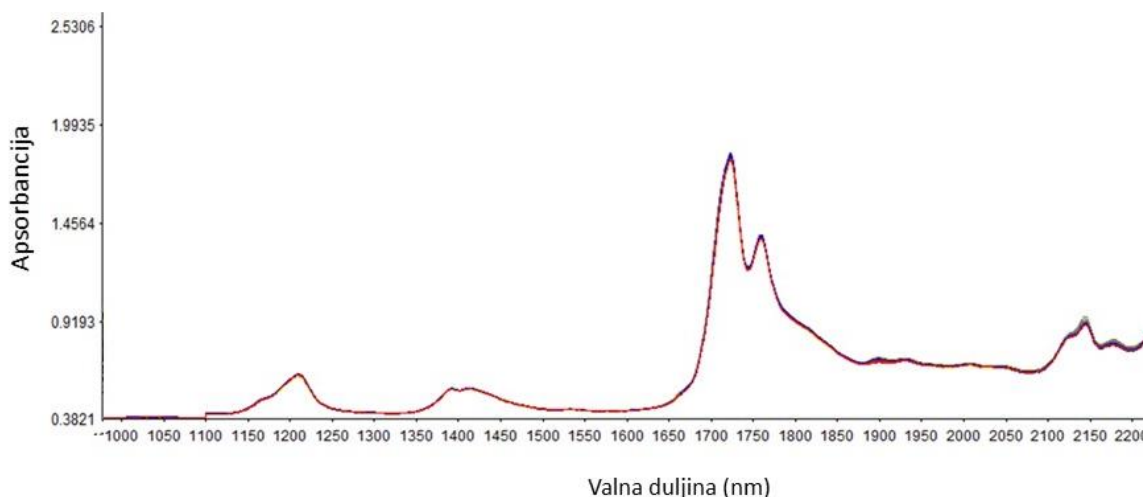
Regija	Istra		Kvarner		Dalmacija	
Broj uzoraka	23		7		11	
Komponenta	Srednja vrijednost	SD	Srednja vrijednost	SD	Srednja vrijednost	SD
C16:0 (%)	12,24	0,68	12,93	0,67	11,73	0,8
C16:1 n-9c (%)	0,09	0,02	0,08	0,01	0,08	0,02
C16:1 n-7c (%)	0,88	0,2	1,13	0,34	0,72	0,12
C17:0 (%)	0,04	0,02	0,05	0,01	0,03	0,02
C17:1 n-7c (%)	0,07	0,03	0,06	0,01	0,05	0,02
C18:0 (%)	2,1	0,24	2,02	0,28	2,04	0,09
C18:1 n-9c (%)	74,12	1,26	70,18	1,65	71,47	1,44
C18:1 n-7c (%)	2,8	0,31	3,14	0,53	2,6	0,27
C18:2 n-6c (%)	6,39	0,89	9,14	1,79	9,96	1,78
C18:3 n-3c (%)	0,57	0,06	0,61	0,07	0,56	0,04
C20:0 (%)	0,31	0,06	0,3	0,05	0,34	0,05
C20:1 n-9c (%)	0,23	0,05	0,23	0,05	0,23	0,05
C22:0 (%)	0,11	0,04	0,1	0,04	0,11	0,04
C24:0 (%)	0,05	0,02	0,05	0,01	0,05	0,02
MUFA/PUFA	11,42	1,42	7,93	1,38	7,43	1,68
oleinska kiselina/linolna kiselina	11,81	1,53	7,96	1,43	7,49	1,77
PLP (%)	1,28	0,17	1,9	0,37	1,41	0,23
POP/PPO (%)	4,2	0,53	4,76	0,44	4,06	0,61
PLL (%)	1,01	0,16	1,68	0,43	1,33	0,22
POL (%)	6,08	0,71	8,65	1,24	7,76	0,96
POO (%)	29,26	1,73	28,21	1,69	25,38	1,98
POS (%)	0,84	0,92	0,73	0,85	0,62	0,86
LLL (%)	0	0	0,07	0,17	0,05	0,17
LLO/LOL (%)	1,53	0,26	2,19	0,53	2,33	0,54
LOO (%)	7,55	1,2	10,27	1,68	12,47	2,26
OOO (%)	43,8	2,3	37,38	2,92	40,39	2,29
SOO (%)	4,45	1,21	4,17	0,52	4,2	1,49

4.3.3. NIR spektri hrvatskih maslinovih ulja

NIR spektroskopija koristila se za dobivanje „otiska prsta“ maslinovog ulja. Cjelokupni spektar maslinovog ulja snimljenog na NIRS prikazan je na slici 16, a odabrano NIR područje za zemljopisnu karakterizaciju na slici 17.



Slika 16. Snimljeni spektar maslinovog ulja iz Istre u području od 400 do 2500 nm dobiven NIR spektroskopijom.

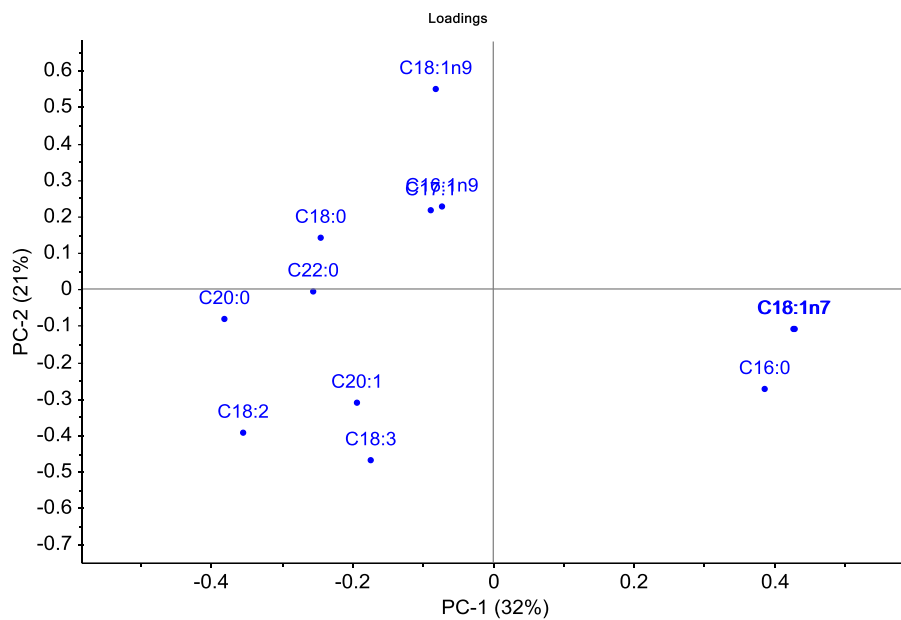


Slika 17. NIR spektri maslinovih ulja iz Hrvatske u području od 1000 do 2222 nm.

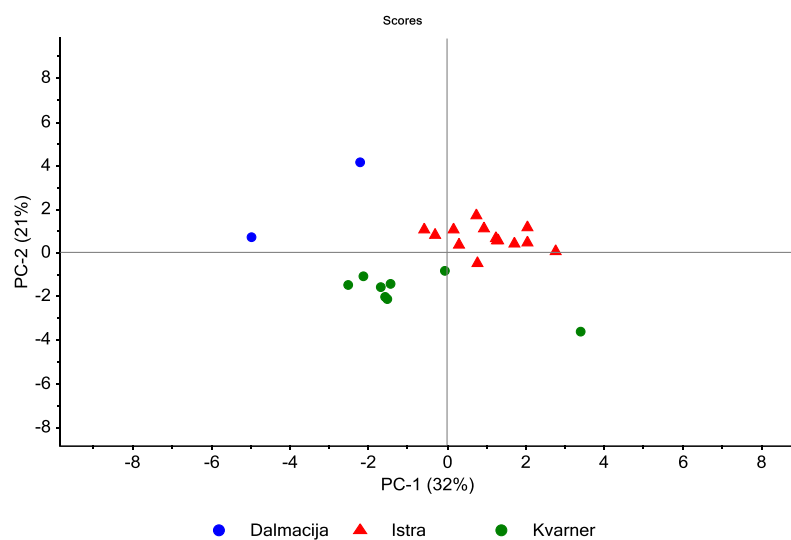
4.4. Mogućnosti uporabe analitičkih metoda u kombinaciji s kemometrijom u otkrivanju autentičnosti maslinovih ulja

4.4.1. Analiza uzoraka iz 2014. godine metodom PCA

Kako bi se utvrdio utjecaj sastava masnih kiselina, triacilglicerola ili NIR spektra maslinovog ulja na grupiranje uzoraka po zemljopisnoj pripadnosti, provedena je statistička obrada metodom glavnih komponenti (PCA). PCA omogućava sažimanje većega broja međusobno povezanih izvornih varijabli u manji broj zajedničkih glavnih komponenti koji će opisivati izvorne varijable te objasniti njihovu međusobnu povezanost. Kao varijable u ovim analizama koristile su se „udio masnih kiselina“ ili „udio TAG“ ili „NIR spektar“ u području od 1000 do 2222 nm. Analiza je najprije provedena na svim hrvatskim uzorcima maslinovog ulja iz 2014. godine, a PCA grafovi prikazani su na slikama 18-20.

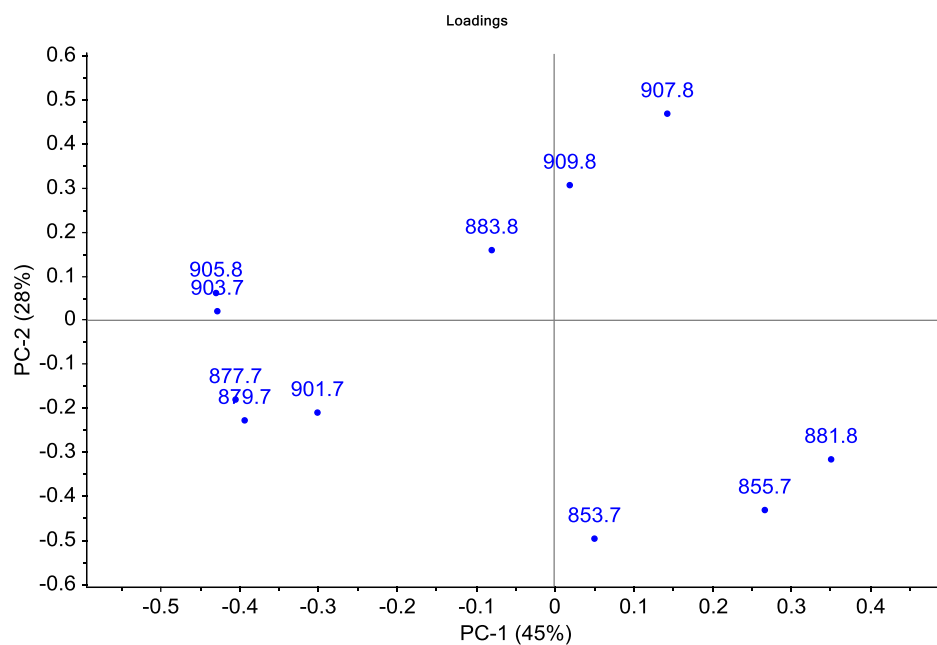


a)

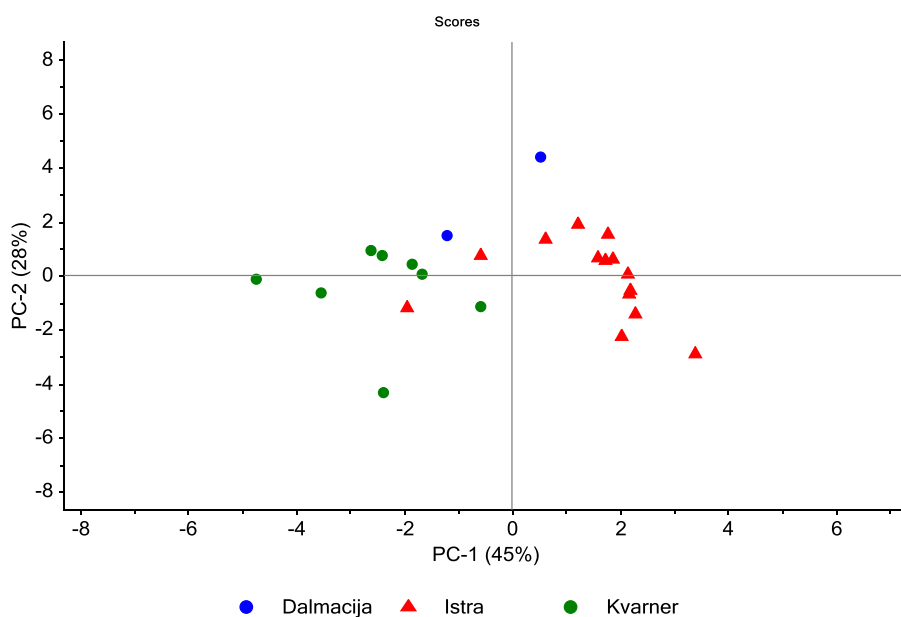


b)

Slika 18. PCA s uzorcima maslinovog ulja iz 2014. godine u kojoj su varijable sastav i udio masnih kiselina: a) projekcija varijabli u prostoru glavnih komponenti (PC1 i PC2), b) projekcija uzoraka i njihovo grupiranje u prostoru glavnih komponentata (PC1 i PC2).

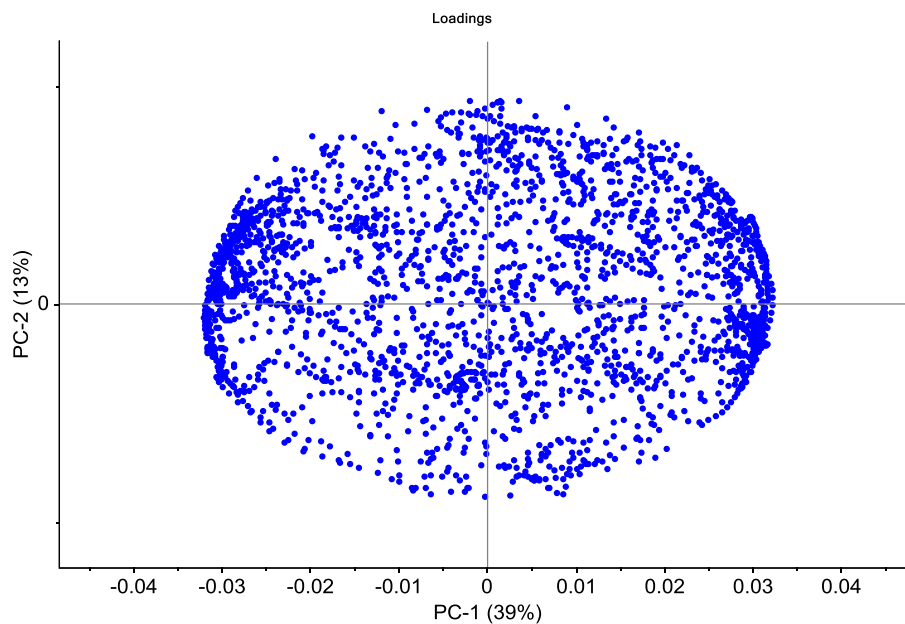


a)

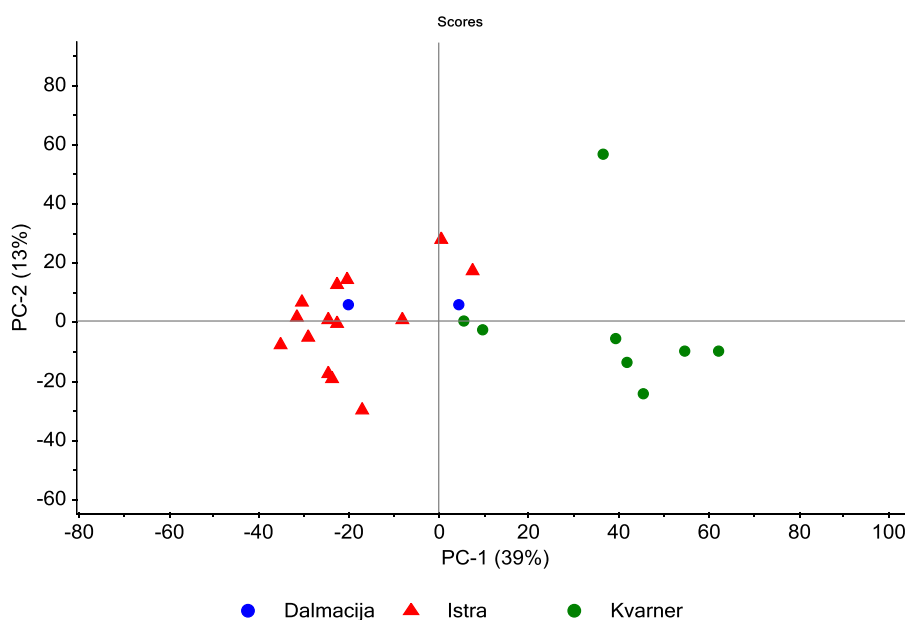


b)

Slika 19. PCA s uzorcima maslinovog ulja iz 2014. godine u kojoj su varijable sastav i udio triacilglicerola: a) projekcija varijabli u prostoru glavnih komponenti (PC1 i PC2), b) projekcija uzoraka i njihovo grupiranje u prostoru glavnih komponenata (PC1 i PC2).



a)



b)

Slika 20. PCA s uzorcima maslinovog ulja iz 2014. godine u kojoj su varijable NIR spektar maslinovog ulja od 1000 do 2222 nm : a) projekcija varijabli u prostoru glavnih komponenti (PC1 i PC2), b) projekcija uzoraka i njihovo grupiranje u prostoru glavnih komponentata (PC1 i PC2).

4.4.2. Analiza uzoraka iz 2015. godine metodom PCA

Prije analize PCA uzoraka iz 2015. provedena je i analiza varijanci kako bi se ispitala povezanost kategorije ulja i udjela glavnih komponenta ulja (tablica 12). Kod PCA analize uzoraka iz 2015. odabrani su samo reprezentativni hrvatski uzorci (n=41) koji pripadaju kategoriji EDMU, a koji će se kasnije koristiti za stvaranje kalibracijskog modela. Dobivena projekcija varijabli i uzoraka u prostoru glavnih komponentata (PC1 i PC2) prikazana je na slikama 21-23.

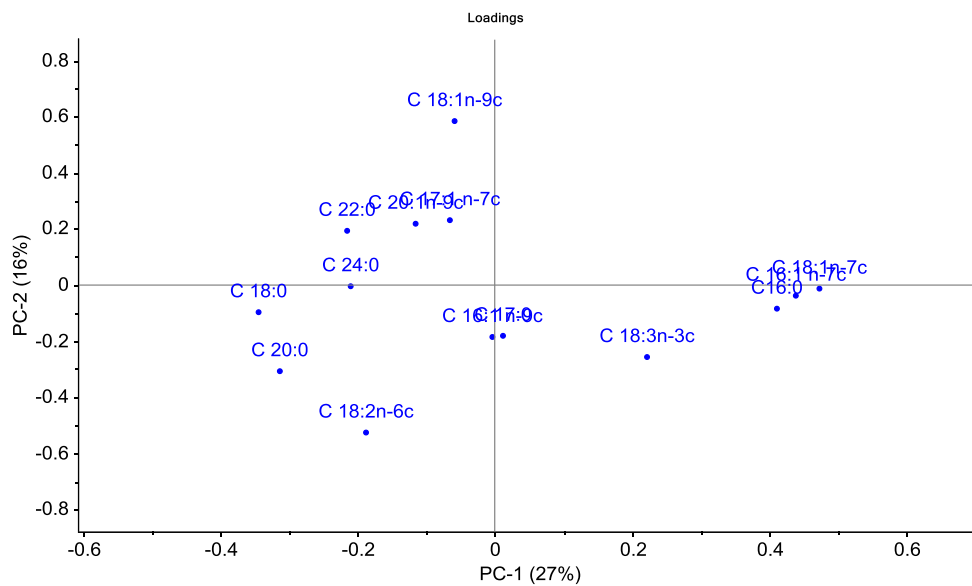
Tablica 12. Vrijednost Fischerovog koeficijenta i p-vrijednosti dobivene jednosmjernom analizom varijanci. ANOVA je pokazala da postoji povezanost između kategorije ulja i udjela pojedinih triacilglicerola, stoga je u daljnjem istraživanju korištena samo kategorija ekstra djevičanskih ulja.

Varijabla		Kategorije ulja	
		F	p-vrijednost
Udio triacilglicerola	853.7	2,15	0,122
	855.7	0,08	0,925
	877.7	5,24	0,007**
	879.7	6,47	0,002**
	881.8	0,04	0,964
	883.8	0,71	0,494
	901.7	28,62	<0,001***
	903.7	12,86	<0,001***
	905.8	3,00	0,055
	907.8	0,63	0,533
	909.8	3,96	0,023*

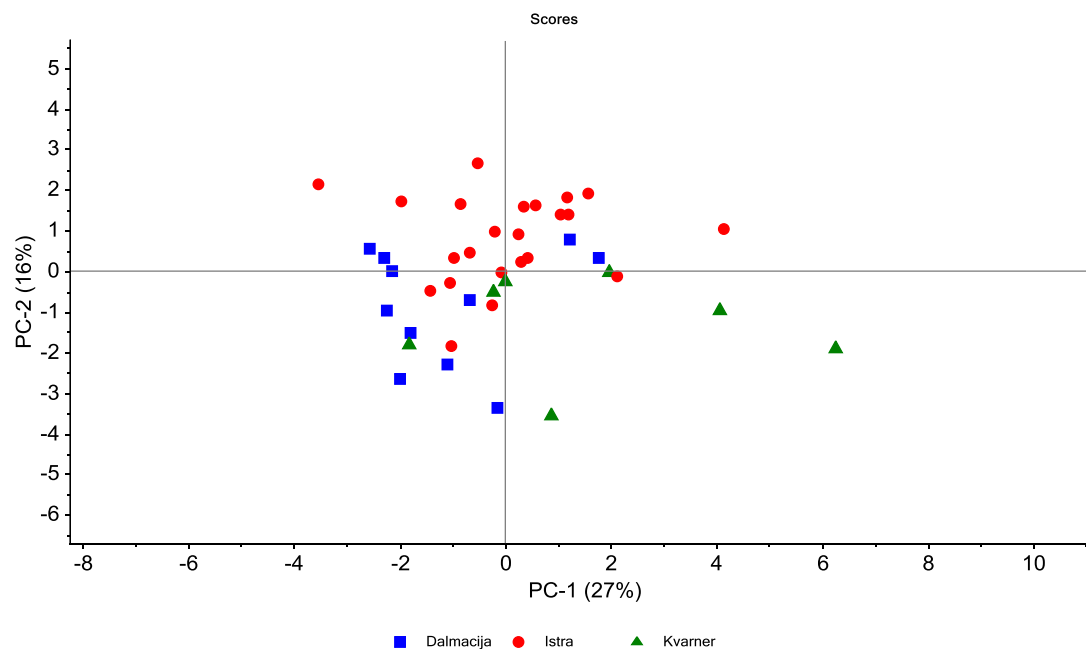
*statistička značajnost na razini $p \leq 0,05$

** statistička značajnost na razini $p \leq 0,01$

*** statistička značajnost na razini $p \leq 0,001$

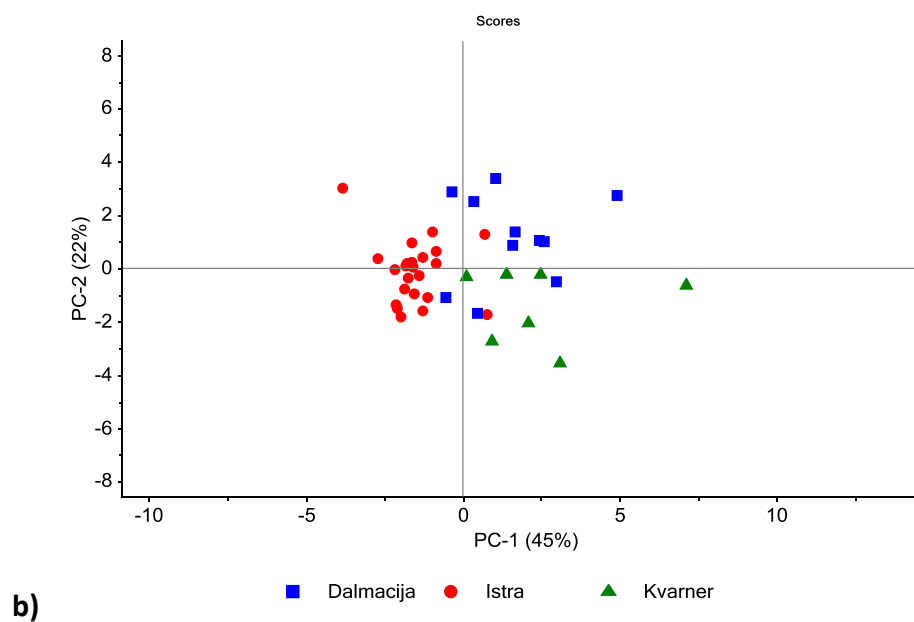
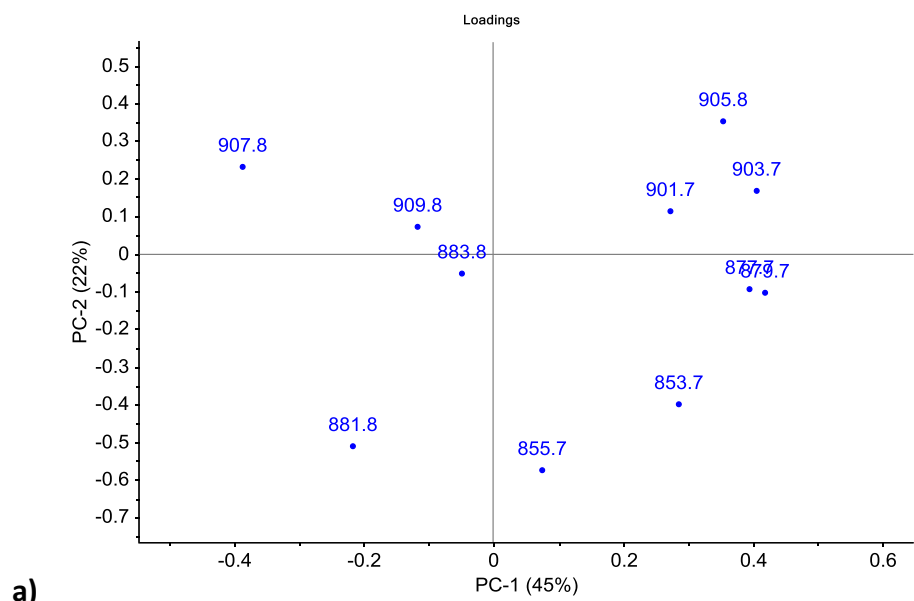


a)

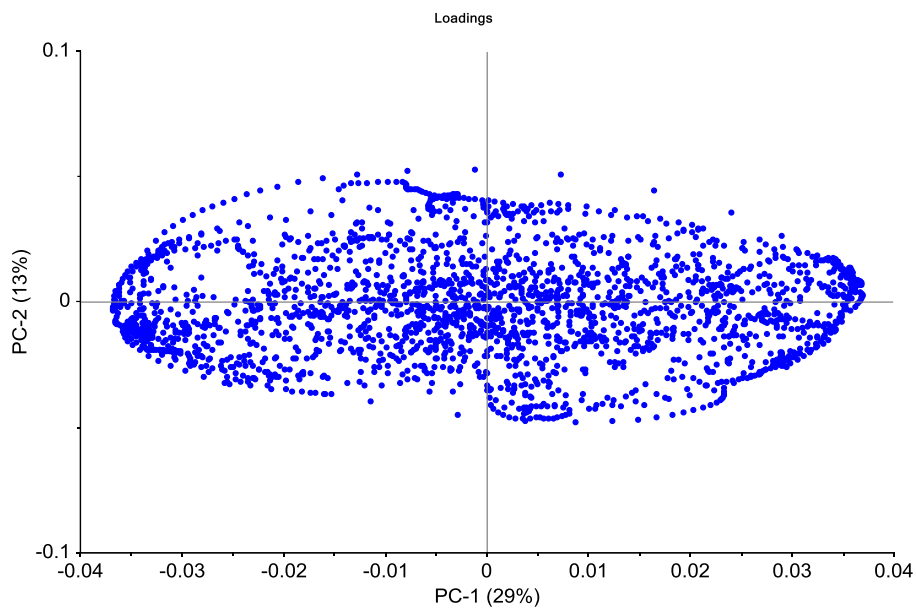


b)

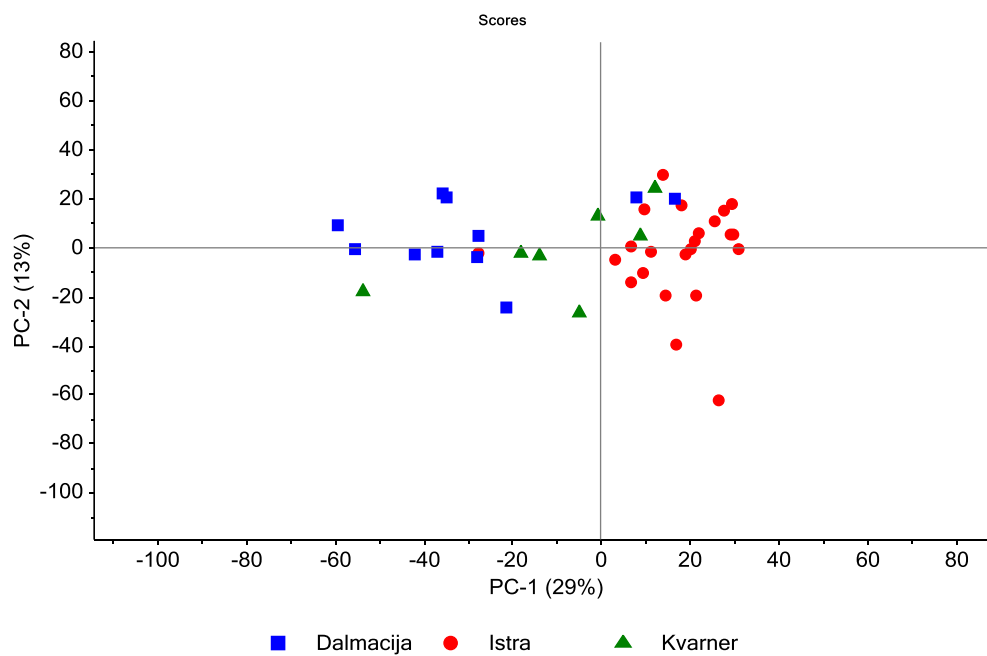
Slika 21. PCA s uzorcima maslinovog ulja iz 2015. godine u kojoj su varijable sastav i udio masnih kiselina: a) projekcija varijabli u prostoru glavnih komponenti (PC1 i PC2), b) projekcija uzoraka i grupiranje u prostoru glavnih komponentenata (PC1 i PC2).



Slika 22. PCA s uzorcima maslinovog ulja iz 2015. godine u kojoj su varijable sastav i udio triacilglicerola: a) projekcija varijabli u prostoru glavnih komponenti (PC1 i PC2), b) projekcija uzoraka i grupiranje u prostoru glavnih komponentata (PC1 i PC2).



a)

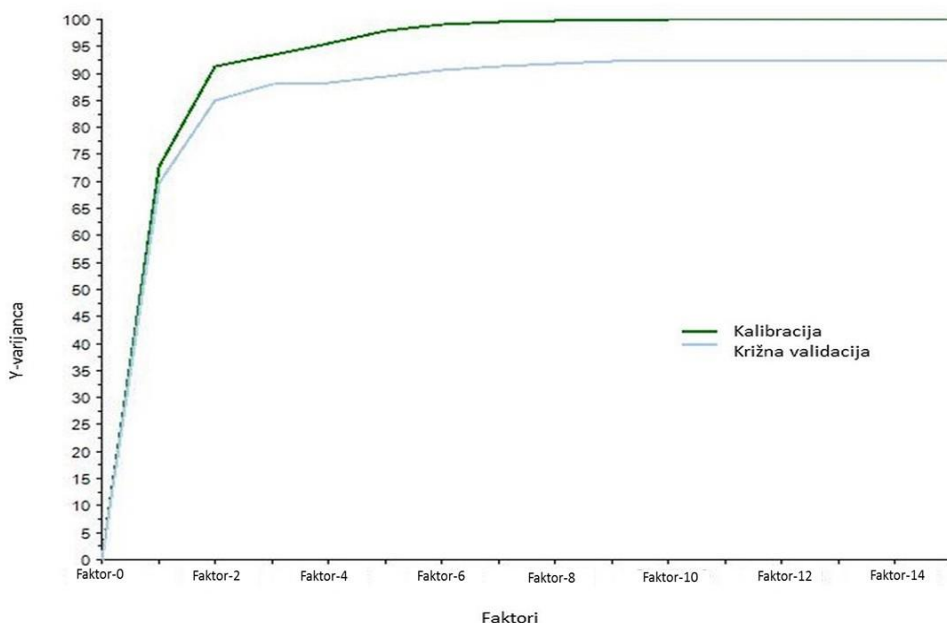


b)

Slika 23. PCA s uzorcima maslinovog ulja iz 2015. godine u kojoj su varijable NIR spektar od 1000 do 2222 nm : a) projekcija varijabli u prostoru glavnih komponenti (PC1 i PC2), b) projekcija uzoraka i grupiranje u prostoru glavnih komponentenata (PC1 i PC2).

4.4.3. Određivanje zemljopisnog podrijetla ekstra djevičanskih maslinovih ulja metodom PLS-DA

Modeli za predikciju zemljopisnog područja napravljeni su uz pomoć metode PLS-DA. Za svaki model bilo je potrebno odabrati optimalni broj faktora (slika 24). Modeli su ocijenjeni na temelju dobivenih statističkih parametara (tablica 13). Također, provedena je i identifikacija važnih varijabli pomoću regresijskog koeficijenta (slike 25 i 26). Na kraju je provedena klasifikacije 11 novih uzoraka EDMU uz pomoć najuspješnijih modela, a dobivene vrijednosti su prikazane u tablici 14.



Slika 24. Graf ovisnosti varijance Y o broju faktora kod određivanja zemljopisnog područja odabranim varijablama iz NIR područja. Zelena linija predstavlja kalibraciju, dok siva linija predstavlja križnu validaciju. Najveća vrijednost krivulje prije postizanja platoa ukazuje na optimalni broj faktora za dotični model. U ovom modelu odabrana su 3 faktora jer opisuju najveću varijacije u križnoj validaciji.

Tablica 13. Statistički parametri dobiveni PLS-DA u kalibracijskom modelu koristeći različite grupe varijabli.

X varijable	LV ^a	R ² _c ^b	RMSEC ^c	R ² _{cv} ^d	RMSECV ^e
MK	2	0,68	0,279	0,50	0,366
TAG	7	0,81	0,217	0,71	0,273
MK i TAG	3	0,79	0,227	0,57	0,328
NIR spektar	4	0,96	0,093	0,69	0,277
NIR važne varijable	3	0,93	0,128	0,88	0,175

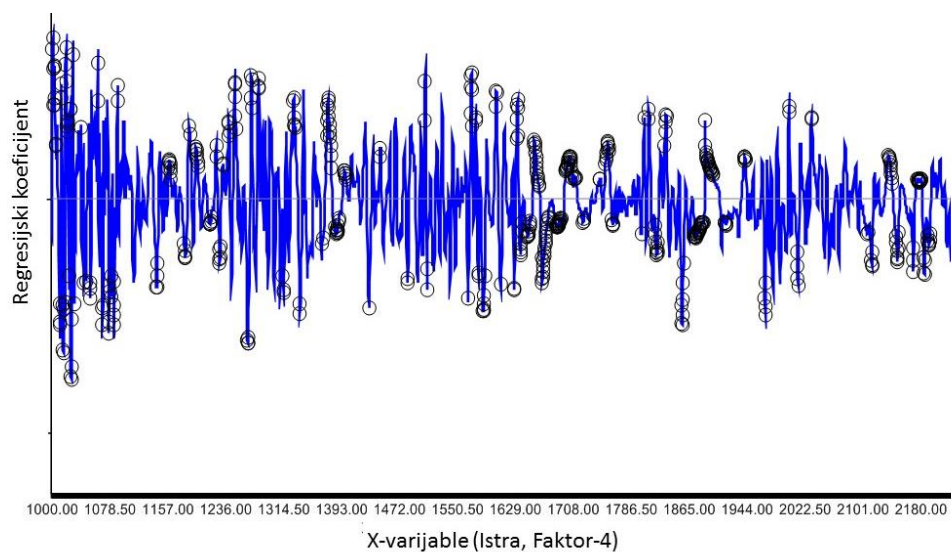
^a LV latentne varijable ili faktori

^bR²_c koeficijent determinacije kalibracije

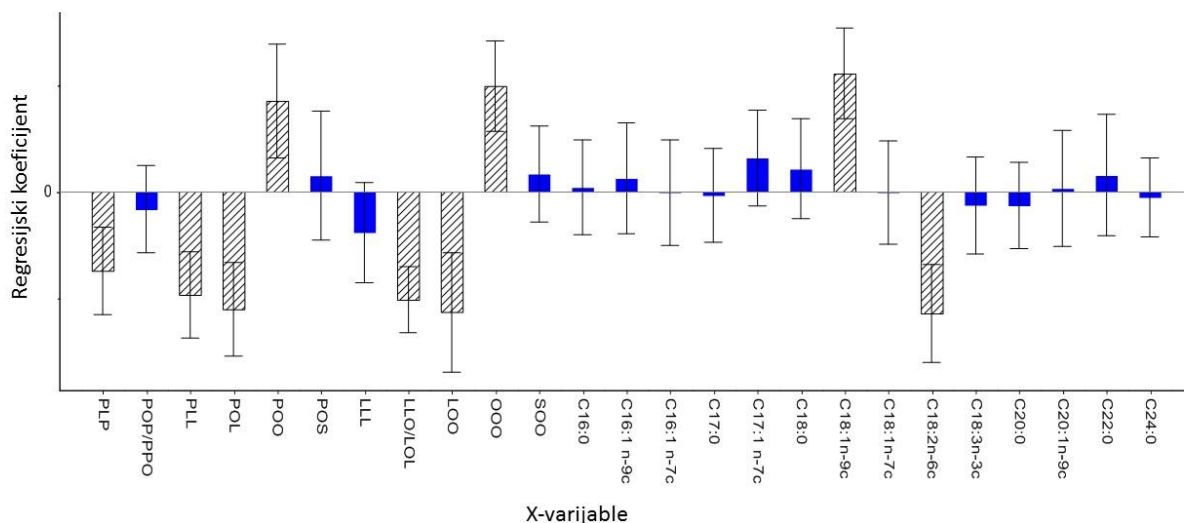
^cRMSEC korijen srednje kvadratne pogreške kalibracije

^dR²_{cv} koeficijent determinacije križne validacije

^eRMSECV korijen srednje kvadratne pogreške križne validacije



Slika 25. X varijable i njihovi regresijski koeficijent kod PLS-DA modela s NIR varijablama. Zaokružene su važne varijable čiji je regresijski koeficijent statistički značajan.



Slika 26. X varijable i njihovi regresijski koeficijent kod modela PLS-DA s masnim kiselinama i triacilglicerolima Kao važne varijable identificirani su PLP, PLL, POL, POO, LLO/LOL, LOO, OOO, C18:1n9 i C18:2n6.

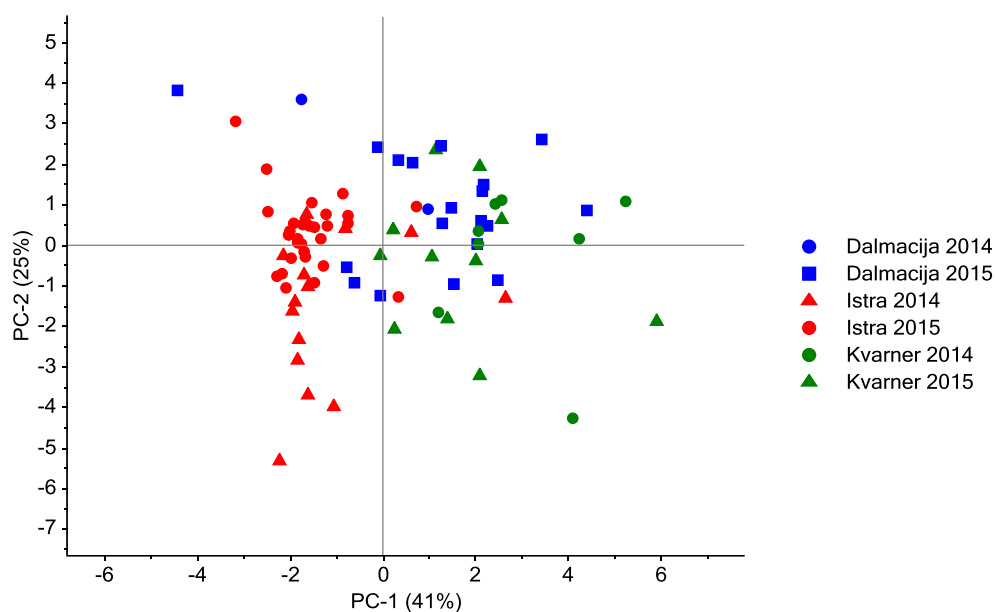
Tablica 14. Rezultati klasifikacije 11 novih EDMU uzoraka iz vanjskog validacijskog seta u modelima PLS-DA s NIR važnim varijablama ili TAG. Vrijednost 1 označava da uzorak pripada grupi, vrijednost 0 da ne pripada, a kao granična vrijednost uzeta je 0,5. U tablici su uspoređene za svaki uzorak njegove predviđene vrijednosti modelima i njihova referentna vrijednost.

Uzorak	Grupa Id			Grupa NI		
	Predviđeni Y		Referentni Y	Predviđeni Y		Referentni Y
	TAG	NIR važne varijable		TAG	NIR važne varijable	
Id1	1,232	1,183	1	-0,232	-0,183	0
Id2	0,925	0,966	1	0,075	0,034	0
Id3	1,104	0,990	1	-0,104	0,010	0
Id4	1,062	0,754	1	-0,062	0,246	0
Id5	1,165	0,769	1	-0,165	0,231	0
Id6c	0,940	0,648	1	0,060	0,352	0

Id7c	1,234	0,972	1	-0,234	0,028	0
NI1	0,205	0,318	0	0,795	0,682	1
NI2	0,134	-0,034	0	0,866	1,034	1
NI3c	0,236	-0,089	0	0,764	1,089	1
NI4c	1,185	0,792	0	-0,185	0,208	1

4.4.3.1. Primjenjivost modela na različite godine proizvodnje i šire zemljopisno područje

Zbog varijabilnosti sastava maslinovih ulja u različitim godinama proizvodnje potrebno je usporediti maslinova ulja iz različitih godina proizvodnje (slika 27). Primjenjivost dva najbolja modela PLS-DA ispitana je na uzorcima iz različitih godina proizvodnje (tablice 15 i 16). Također, ispitano je i ponašanje uzoraka maslinovih ulja koji nisu iz Hrvatske uz pomoć metoda PCA (slika 28) i PLS-DA.



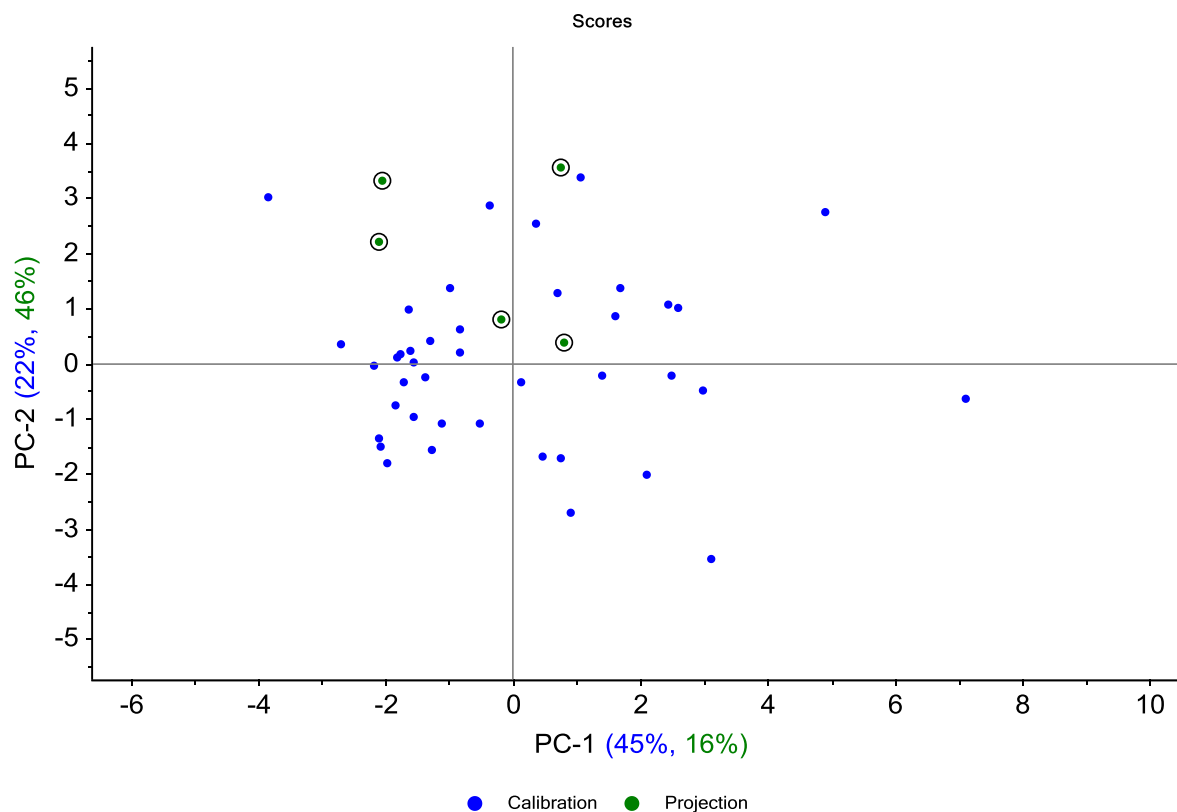
Slika 27. Projekcija uzoraka iz 2014. i 2015. godine (n=84) u prostoru glavnih komponenta (PC1 i PC2). Kao varijable u analizi korišten je sastav i udio triacilglicerola.

Tablica 15. Rezultati klasifikacije 14 EDMU/DMU uzoraka iz 2014. na temelju kalibracijskog modela PLS-DA s važnim NIR varijablama ili TAG dobivenih analizom uzoraka iz 2015. godine. Vrijednost 1 označava da uzorak pripada grupi, vrijednost 0 da ne pripada, a kao granična vrijednost uzeta je 0,5. U tablici su uspoređene modelima predviđene vrijednosti i njihova referentna vrijednost za svaki uzorak .

Uzorak	Grupa Ic			Grupa NI		
	Predviđeni Y		Referentni Y	Predviđeni Y		Referentni Y
	TAG	NIR važne varijable		TAG	NIR važne varijable	
Ic1	0.863	0.685	1	0.137	0.315	0
Ic2	1.217	1.101	1	-0.217	-0.101	0
Ic3	1.016	0.901	1	-0.016	0.099	0
Ic4	1.009	0.869	1	-0.009	0.131	0
Ic5	0.726	0.676	1	0.274	0.324	0
Ic6	1.120	0.764	1	-0.120	0.236	0
Ic7	1.224	0.848	1	-0.224	0.152	0
Ic8	0.945	0.891	1	0.055	0.109	0
Ic11	0.988	1.014	1	0.012	-0.014	0
Ic12	1.197	0.861	1	-0.197	0.139	0
Ic13	0.876	1.019	1	0.124	-0.019	0
Ic14	0.784	0.844	1	0.216	0.156	0
Kb8	0.379	0.161	0	0.621	0.839	1
Db1	0.801	0.818	0	0.199	0.182	1

Tablica 16. Rezultati klasifikacije 6 EDMU uzoraka iz 2013. na temelju kalibracijskog modela PLS-DA s važnim NIR varijablama ili TAG dobivenih analizom uzoraka iz 2015. godine. Vrijednost 1 označava da uzorak pripada grupi, vrijednost 0 da ne pripada, a kao granična vrijednost uzeta je 0,5. U tablici su uspoređene modelima predviđene vrijednosti i njihova referentna vrijednost za svaki uzorak .

Uzorak	Grupa Ib			Grupa NI		
	Predviđeni Y		Referentni Y	Predviđeni Y		Referentni Y
	TAG	NIR važne varijable		TAG	NIR važne varijable	
Ib1	1,423	0,914	1	-0,423	0,086	0
Ib2	1,278	0,615	1	-0,278	0,385	0
Ib3	1,408	0,798	1	-0,408	0,202	0
Ib4	0,826	1,065	1	0,174	-0,066	0
Ib5	1,574	0,890	1	-0,574	0,110	0
Ib6	1,355	0,821	1	-0,355	0,179	0



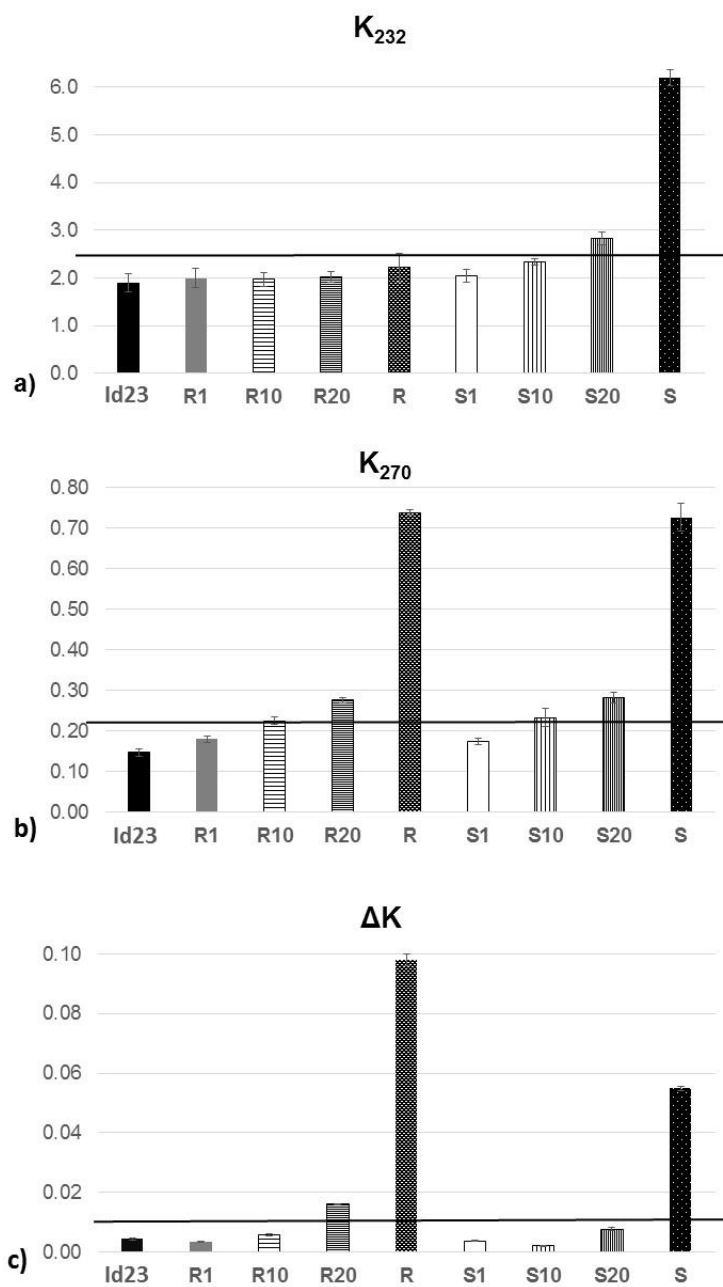
Slika 28. Projekcija uzoraka ekstra djevičanskih maslinovih ulja koji nisu iz Hrvatske u prostoru glavnih komponenti (PC1 i PC2) dobivenih kalibracijskom PCA analizom s uzorcima iz Hrvatske (2015. godina) u kojoj su varijable sastav TAG. Zelenim zaokruženim kružićem su označeni uzorci koji nisu hrvatski, a plavim kružićima kalibracijski hrvatski uzorci maslinovog ulja.

4.4.4. Mogućnosti MALDI-TOF u određivanju krivotvorenja

U istraživanju krivotvorenja maslinovog ulja uspoređene su dvije metode: spektrofotometrijska analiza u UV području i MALDI-TOF analiza. U uzorcima namijenjenim za analizu krivotvorenja određeni su K-brojevi (tablica 17) te je testirana primjenjivost njihovih graničnih vrijednosti na otkrivanje krivotvorenja (slika 29). U istim uzorcima analizirani su i relativno kvantificirani TAG (tablica 18). Usporedba MALDI-TOF spektra u području triacilglicerola od 850 do 920 m/z između čistog uzorka i njegovih izvora krivotvorenja prikazana je na slici 29, dok je na slikama 31 i 32 prikazan utjecaj dodatka izvora krivotvorenja na odabrane TAG. No, radi boljeg razumijevanja do koje je mjere analiza TAG uz pomoć MALDI-TOF osjetljiva na krivotvorenje provedena je PCA analiza (slike 33-36).

Tablica 17. K-brojevi određeni za ekstra djevičansko maslinovo ulje Id23 i njegove krivotvorine (R1, R10, R20, S1, S10 i S20) te ulja koja su se koristila za simulaciju krivotvorenja (jestivo suncokretovo ulje S, maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja R).

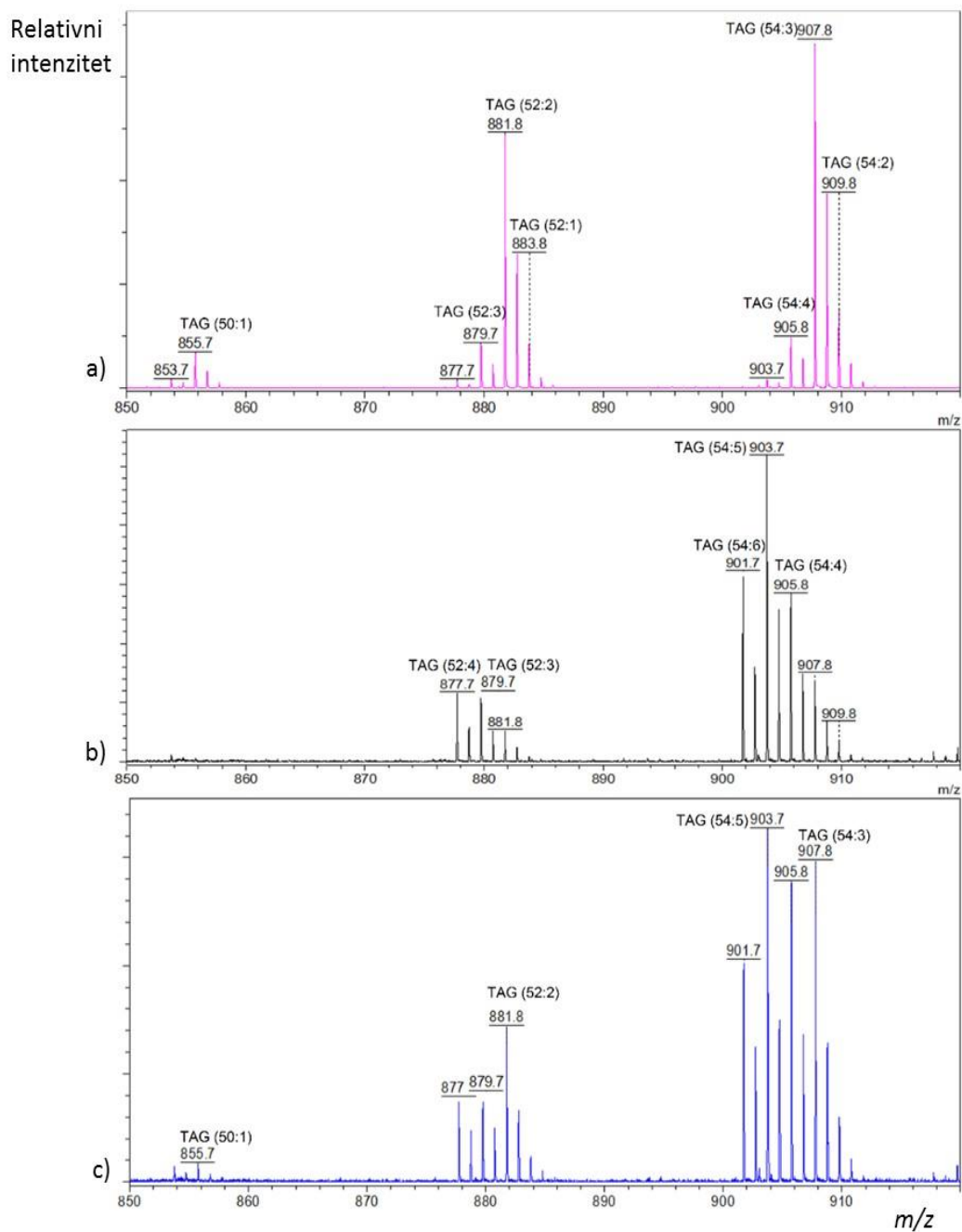
Uzorak	K ₂₃₂	K ₂₇₀	ΔK
Id23	1,90	0,15	0,0044
R	2,22	0,74	0,0980
R1	1,99	0,18	0,0033
R10	1,97	0,22	0,0056
R20	2,02	0,28	0,0160
S	6,20	0,73	0,0549
S1	2,05	0,17	0,0036
S10	2,34	0,23	0,0020
S20	2,83	0,28	0,0076



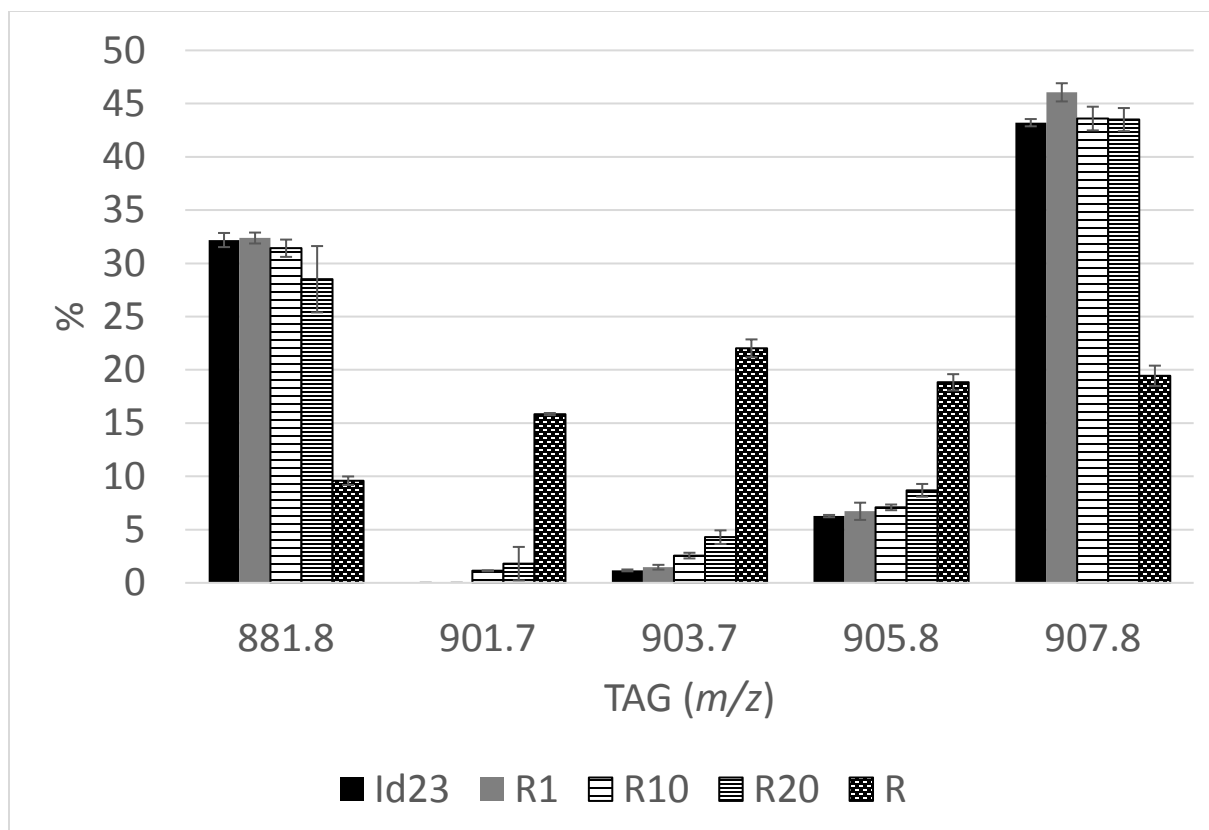
Slika 29. Mogućnost detekcije krivotvorenja ekstra djevičanskog maslinovog ulja Id23 sa S i R na temelju zadanih graničnih vrijednosti za a) K_{232} , b) K_{270} , c) ΔK . Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina tri određivanja. Crtom su označene granične vrijednosti propisane pravilnikom za kategoriju EDMU ($K_{232} \leq 2,50$; $K_{270} \leq 0,22$; $\Delta K \leq 0,01$).

Tablica 18. Vrste i udio pojedinog TAG određen uz pomoć MALDI-TOF/MS u uzorcima za ispitivanje krivotvorenja.

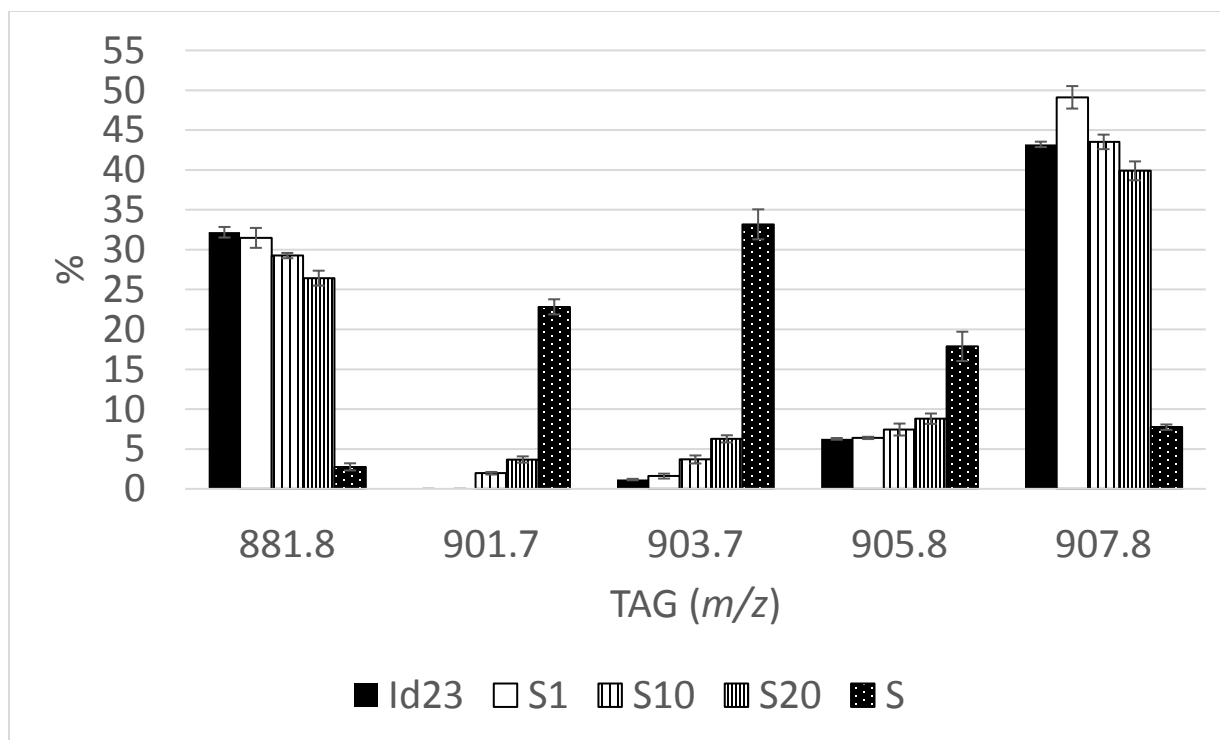
Uzorak	Vrsta TAG										
	853.7	855.7	877.7	879.7	881.8	883.8	901.7	903.7	905.8	907.8	909.8
Id23	1,04	4,47	0,81	5,60	32,19	1,45	0,00	1,17	6,27	43,21	3,77
R	0,47	1,06	6,47	6,28	9,59	0,00	15,85	22,02	18,83	19,44	0,00
R1	1,23	4,24	0,30	5,41	32,38	0,00	0,00	1,47	6,72	46,06	2,19
R10	1,06	3,85	1,25	5,49	31,42	0,33	1,13	2,56	7,09	43,60	2,23
R20	0,30	3,93	1,24	6,05	28,51	0,45	1,80	4,29	8,69	43,50	1,23
S	0,20	0,00	8,62	6,29	2,76	0,00	22,83	33,18	17,87	7,74	0,52
S1	0,41	3,87	0,43	5,18	31,48	0,00	0,00	1,60	6,39	49,11	1,53
S10	0,94	4,08	1,74	6,26	29,26	0,00	1,96	3,69	7,44	43,52	1,10
S20	0,79	3,68	2,18	5,94	26,43	0,00	3,68	6,27	8,80	39,89	2,34



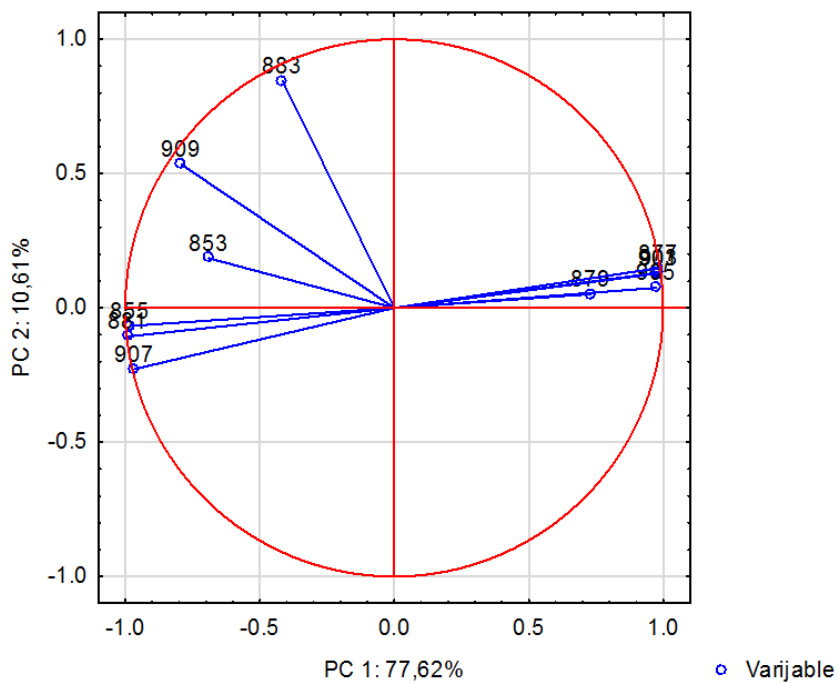
Slika 30. Usporedba MALDI-TOF spektra u području od 850 do 920 m/z između uzoraka a) ekstra djevičanskog maslinovog ulja (Id23), b) jestivog suncokretovog ulja (S) i c) maslinovog ulja sastavljenog od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja (R) (Jergović i sur., 2017).



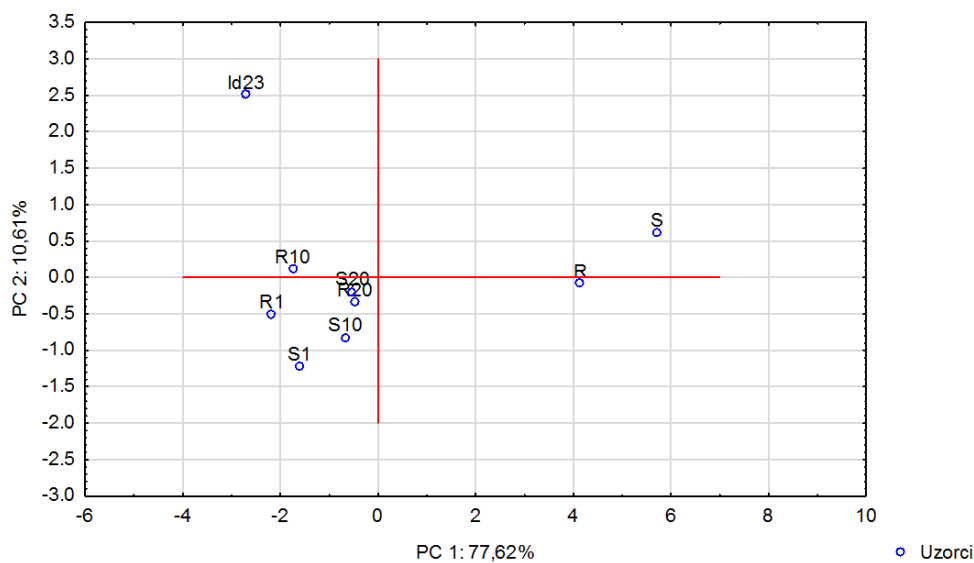
Slika 31. Usporedba između sadržaja najznačajnijih TAG (m/z 881.8, 901.7, 903.7, 905.8 i 907.8) za ekstra djevičansko maslinovo ulje (Id23) i maslinovog ulja sastavljenog od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja (R) te njihovih mješavina (R1, R10 i R20). Dodavanjem R u Id23 postupno se mijenja udio prikazanih TAG na način da se manje zastupljenim TAG povećava udio, dok se udio TAG karakterističnih za ekstra djevičansko maslinovo ulje smanjuje (Jergović i sur., 2017).



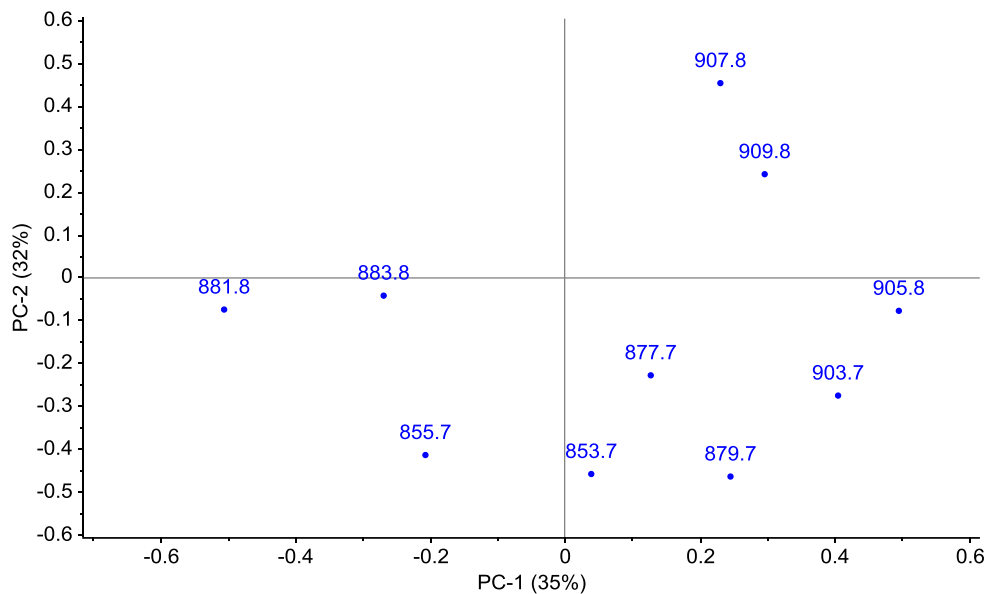
Slika 32. Usporedba između sadržaja najznačajnijih TAG (m/z 881.8, 901.7, 903.7, 905.8 i 907.8) za ekstra djevičansko maslinovo ulje (Id23) i suncokretovog ulja (S) te njihovih mješavina (S1, S10 i S20). Dodavanjem S u Id23 postupno se mijenja udio prikazanih TAG na način da se manje zastupljenim TAG povećava udio, dok se udio TAG karakterističnih za ekstra djevičansko maslinovo ulje smanjuje (Jergović i sur., 2017).



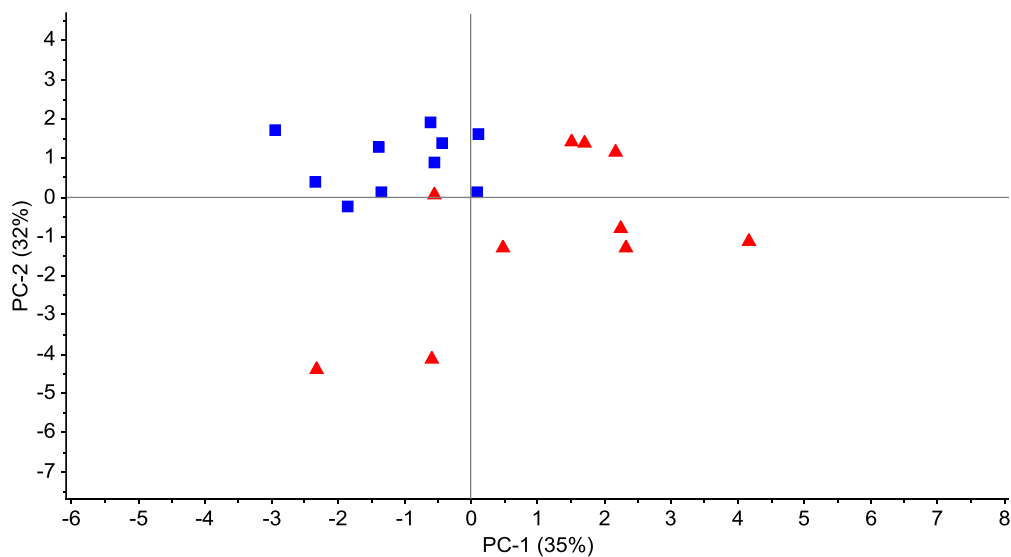
Slika 33. Projekcija varijabli u prostoru glavnih komponenti (PC1 i PC2) (Jergović i sur., 2017).



Slika 34. Projekcija uzoraka Id23, R i S te mješavina u prostoru glavnih komponenti (PC1 i PC2) na temelju TAG varijabli (Jergović i sur., 2017).



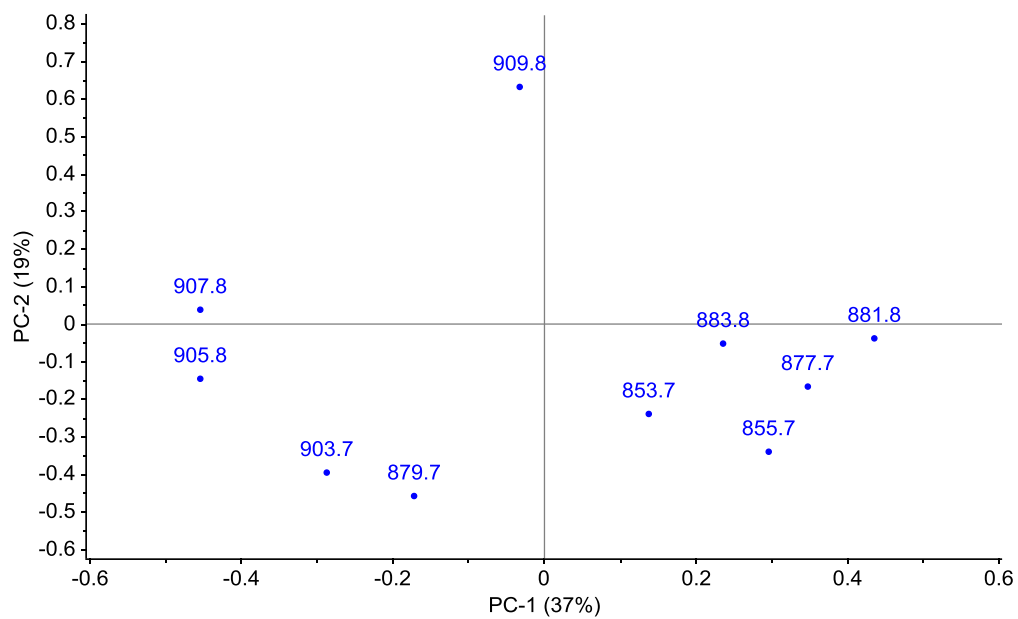
a)



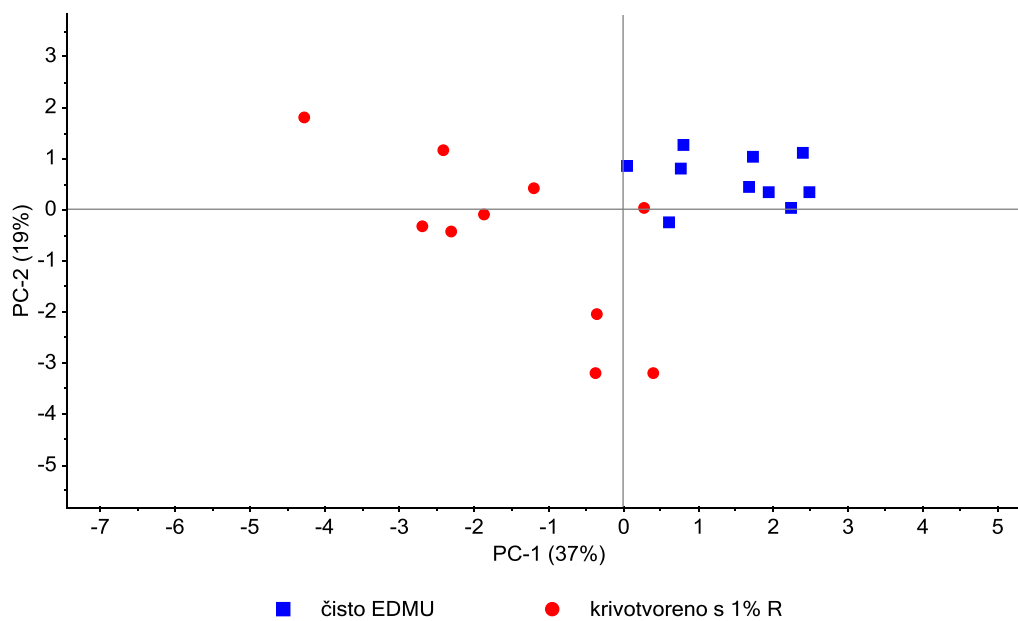
■ čisto EDMU ▲ krivotvoreno s 1% S

b)

Slika 35. Projekcija a) varijabli i b) uzoraka u prostoru glavnih komponenti (PC1 i PC2). U provedenoj analizi uzorci su ekstra djevičanska maslinova ulja i njihove mješavine nastale dodavanjem 1 % jestivog suncokretovog ulja. U PCA grafu ekstra djevičanska ulja su označena sa plavim kvadratićem, a mješavine s 1 % S su označene s crvenim trokutićem.



a)



b)

Slika 36. Projekcija a) varijabli i b) uzoraka u prostoru glavnih komponenti (PC1 i PC2). U provedenoj analizi uzorci su ekstra djevičanska maslinova ulja i njihove mješavine nastale dodavanjem 1 % R. U PCA grafu ekstra djevičanska ulja su označena sa plavim kvadratićem, a mješavine s 1 % R su označene crvenim kružićem.

4.5. Određivanje osnovnih parametara kvalitete te sadržaja glavnih komponenti ulja pomoću NIR spektroskopije

U sklopu istraživanja ispitala se i mogućnost određivanja osnovnih parametara kvalitete i sadržaja glavnih komponenta ulja iz NIR spektra. Metodom PLS kreirani su kalibracijski modeli za svaki pojedini parametar kvalitete, a uz pomoć dobivenih statističkih parametara provedena je njihova procjena (tablica 19). Učinkovitost modela u predikciji pojedinog parametra kvalitete ispitana je na novim uzorcima koji se nisu koristili u koraku kalibracije (slika 37). Linearnom regresijom ispitala se povezanost pojedinih valnih duljina NIR spektra sa sadržajem masnih kiselina (slika 38), dok se metodom PLS dobila cjelovitija analiza povezanosti sadržaja TAG i masnih kiselina sa širim područjem NIR spektara (tablica 20).

Tablica 19. Statistički parametri kalibracije i križne validacije u određivanju parametara kvalitete maslinovih ulja iz NIR spektra (n=49).

Parameter kvalitete	SV ^a	SD ^b	Područje	LV ^c	R ² _c ^d	RMSEC ^e	R ² _{cv} ^f	RMSECV ^g	RPD ^h
Slobodne masne kiseline (% oleinske kiseline)	0,44	0,43	0,15 - 2,22	8	0,98	0,067	0,96	0,088	4,89
Peroksidni broj (meq O ₂ /kg ulja)	5,54	5,25	0 - 26,73	8	0,84	2,082	0,69	2,998	1,75
K ₂₃₂	2,00	0,44	1,52 - 3,49	8	0,84	0,173	0,64	0,267	1,65
K ₂₇₀	0,13	0,03	0,08 - 0,21	10	0,74	0,014	0,50	0,019	1,57

^aSV srednja vrijednost

^bSD standardna devijacija

^cLV latentne varijable ili faktori

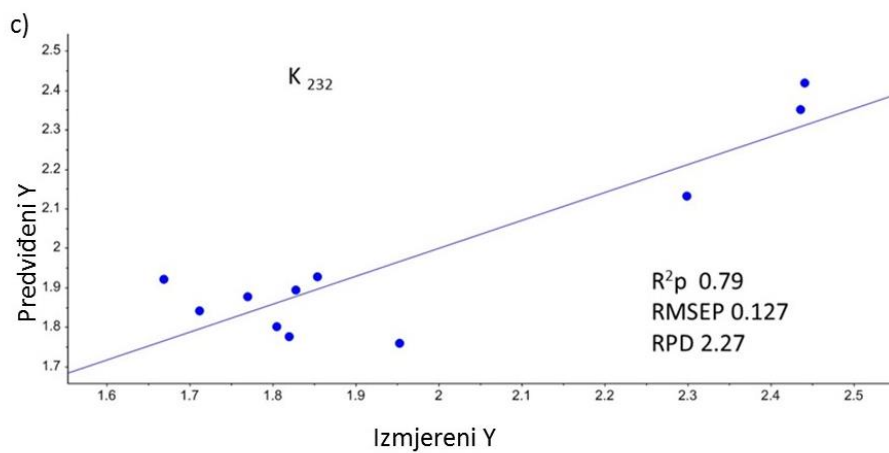
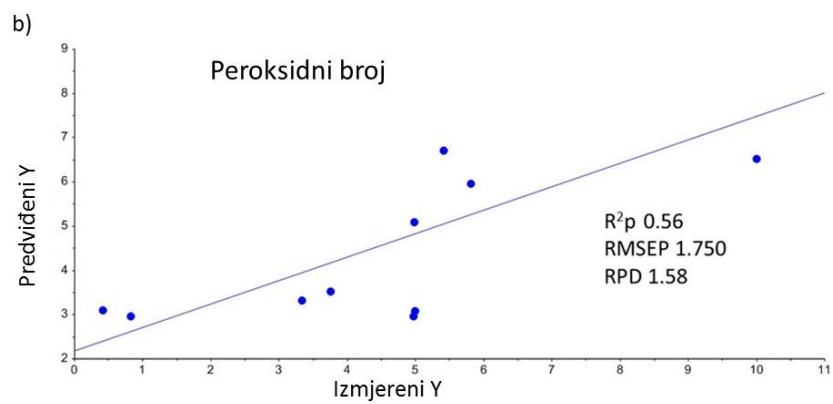
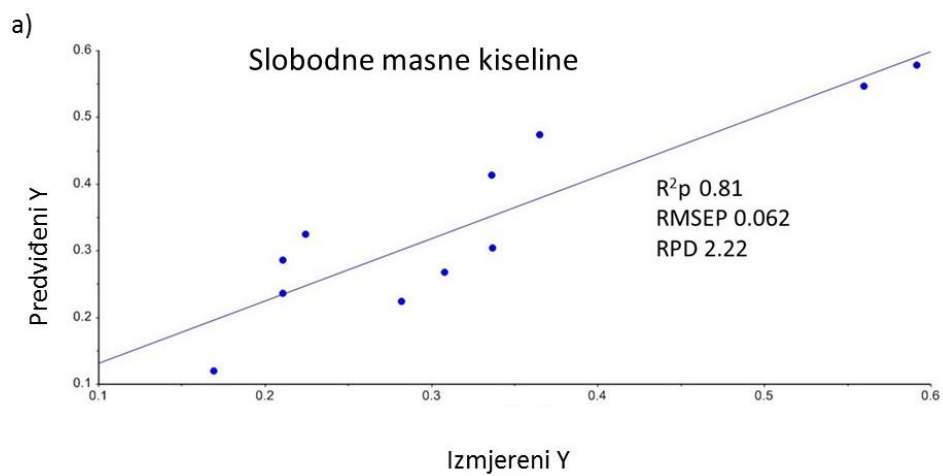
^dR²_c koeficijent determinacije kalibracije

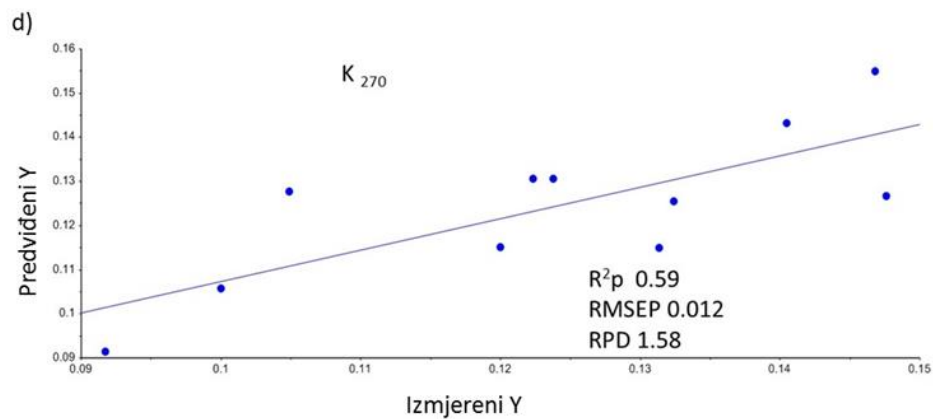
^eRMSEC korijen srednje kvadratne pogreške kalibracije

^fR²_{cv} koeficijent determinacije križne validacije

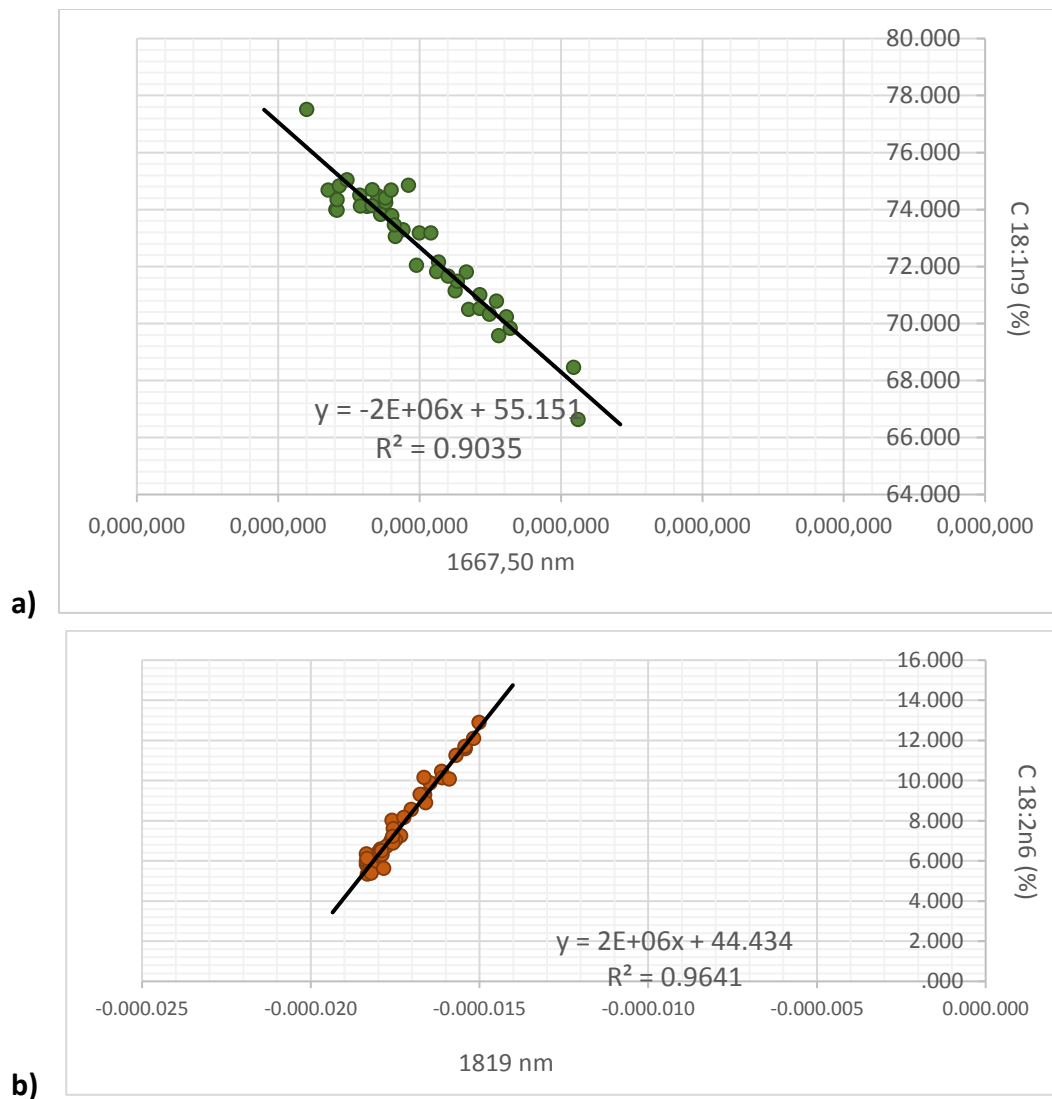
^gRMSECV korijen srednje kvadratne pogreške križne validacije

^hRPD „residual predictive deviation“





Slika 37. Usporedba izmjerenih referentnih vrijednosti i onih predviđenih iz NIR spektra za a) sadržaj slobodnih masnih kiselina, b) peroksidni broj, c) K_{232} vrijednost i d) K_{270} vrijednost kod 11 novih uzoraka maslinovog ulja.



Slika 38. Korelacija između sadržaja a) oleinske kiseline određene analizom GC-MS i apsorbancije ulja pri 1667,5 nm te b) linolne kiseline određene analizom GC-MS i apsorbancije ulja pri 1819 nm. Određene NIR regije mogu biti prediktori sadržaja oleinske i linolne kiseline u maslinovom ulju.

Tablica 20. Određivanje sadržaja TAG i masnih kiselina uz pomoć analize PLS u kojoj se koristio NIR spektar (n=41) u području od 1333 do 2222 nm.

Komponenta	Srednja vrijednost	LV ^a	R ² c ^b	RMSEC ^c	R ² cv ^d	RMSECV ^e	RECV% ^f
PLP	1,42	8	0,71	0,174	0,55	0,222	15,63
POP/PPO	4,26	6	0,69	0,33	0,55	0,404	9,47
PLL	1,21	5	0,7	0,192	0,57	0,233	19,28
POL	6,97	7	0,86	0,516	0,77	0,691	9,92
POO	28,04	5	0,79	1,111	0,71	1,355	4,83
LLO/LOL	1,86	5	0,85	0,211	0,8	0,256	13,77
LOO	9,33	2	0,95	0,612	0,93	0,733	7,85
OOO	41,79	8	0,90	1,104	0,84	1,442	3,45
C16:0	12,22	11	0,97	0,143	0,93	0,221	1,81
C 16:1n-7c	0,88	16	0,92	0,071	0,56	0,172	19,52
C 18:0	2,07	15	0,83	0,093	0,36	0,186	8,97
C 18:1n-9c	72,74	7	0,98	0,334	0,94	0,52	0,71
C 18:1n-7c	2,8	14	0,93	0,106	0,75	0,199	7,11
C 18:2n-6c	7,82	5	0,98	0,304	0,96	0,434	5,55

^aLV latentne varijable ili faktori

^bR²c koeficijent determinacije kalibracije

^cRMSEC korijen srednje kvadratne pogreške kalibracije

^dR²cv koeficijent determinacije križne validacije

^eRMSECV korijen srednje kvadratne pogreške križne validacije

^fRECV% relativna pogreška križne validacije

5. RASPRAVA

5.1. Analize triacilglicerola na MALDI-TOF/MS i MALDI-SpiralTOF/MS

U sklopu istraživanja triacilglicerola razvijene su metode analize na dva instrumenta MALDI-MS s različitim tehnologijama istih vrsta analizatora masa: Bruker Ultraflex extreme TOF masenom spektrometru (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) i JMS-S3000 SpiralTOF masenom spektrometru (JEOL Ltd, Akishima, Japan). Tehnologija JMS-S3000 SpiralTOF masenog spektrometra je evaluirana za potrebe strukturne identifikacije TAG, tj. za MS/MS analizu. Analiza TAG provedena je na različitim uzorcima biljnih ulja kako bi se razvila opće primjenjiva metoda. Kod pripreme uzorka ispitana su dva otapala, heksan i THF za otapanje uzorka i kvalitetno nanošenje uzorka na MALDI pločicu. THF je bio bolji izbor zbog dobrog otapanja uzorka i matrice, ali i svojstva zadržavanja uzorka na uskom području pločice kao i brzog isparavanja. Kod svih analiza kao matrica se koristio DHB zbog već prethodno dokazanih pozitivnih karakteristika u analizi lipida (Schiller i Fuchs, 2013). Međutim, kao bi se optimizirala analiza u svrhu dobivanja kvalitetnog spektra testirane su koncentracije DHB od 10 do 40 mg/ml u metanolu/vodi (90/10 v/v) ili THF. THF je i kao otapalo za matricu imao bolja svojstva, a veće koncentracije DHB osigurale su bolju ionizaciju analita. Kao agens za dobivanje kationa upotrijebljen je natrijev trifluoracetat kojim se potaklo stvaranje natrijevih adukta. Naime, u prijašnjim istraživanjima potvrđeno je kako upravo natrijevi adukti TAG daju najintenzivnije ione koje je stoga i moguće najpreciznije identificirati (Pittenauer i Allmaier, 2009). Kod svih su uzoraka TAG kao natrijevi adukti identificirani u području spektra od m/z 800 do 1000. Dobiveni profili TAG razlikuju se u ovisnosti o vrsti biljnog ulja ponajprije u intenzitetu pojedinih iona TAG (slika 6). Primarna identifikacija TAG u spektru provedena je na temelju usporedbe eksperimentalno dobivenih m/z vrijednosti i izračunatih molekulskih masa uz pomoć besplatno dostupnog alata LIPID MAPS Online Tools (Fahy i sur., 2007) i usporedbom dobivenih eksperimentalnih rezultata s prijašnjim istraživanjima (Calvano i sur., 2012; Chapagain i Wiesman, 2009; Jakab i sur., 2002; Krist i sur., 2006; Lay i sur., 2006; Sakouhi i sur., 2010). U tablici 6 prikazani su detektirani TAG u maslinovim uljima i navedena je njihova primarna identifikacija. Usporedbom eksperimentalno dobivenih m/z vrijednost s izračunatim m/z vrijednostima vidljivo je kako je najveća pogreška u primarnoj

identifikaciji ispod 12 ppm. U spektrima biljnih ulja pronađeno je 13 iona koji pripadaju različitim TAG. U maslinovom ulju snažno dominira ion 907.8 m/z , identificiran kao triolein (OOO). Nešto manji intenzitet ima pik m/z 881.8 identificiran kao 1-palmitoil-2,3-dioleoil- glicerol (POO). U spektru suncokretovog ulja ima više iona jačeg intenziteta što ukazuje da u sastavu ne prevladava jedan TAG, već više njih. Najintenzivniji ion je m/z 903.7, identificiran kao 1,2-dilinoleoil-3-oleoil-glicerol (LLO), a upravo veći intenzitet m/z 903.7 naspram m/z 877.7, razlikuje suncokretovo ulje od ostalih biljnih ulja (Ng i sur., 2018). Nadalje, u suncokretovom ulju je zastupljen i TAG ion m/z 901.7, identificiran kao trilinolein (LLL). Sezamovo ulje također sadrži veći broj TAG koji su značajno zastupljeni. U spektru sezamovog ulja ioni s većim intenzitetom su m/z 901.7 (LLL), 903.7 (LLO), 905.8 (LOO) i 907.8 (OOO). Analiza profila TAG u uljima ukazala je na to da je za svako ulje prisutan karakterističan profil temeljem čega se može utvrditi vrsta ulja. Također, zanimljivo je istražiti da li unutar iste vrste ulja postoje razlike zbog čega je provedena relativna kvantifikacija pojedinih TAG. Iako analiza MALDI-TOF/MS kod proteina ne omogućava kvantifikaciju proteina u uzorku zbog heterogene kristalizacije matrice i uzorka, to nije slučaj kod lipida (Schiller and Fuchs, 2013). Naime, dobro otapanje uzorka lipida i matrice u organskom otapalu omogućava homogenu kristalizaciju uzorka/matrice na MALDI pločici. Na slici 7 prikazan je MALDI „spot“ s nanesenim uzorkom ulja gdje je vidljivo kako su kristali podjednaki i ravnomjerni na cijelom području uzorka. Analiza TAG različitih maslinovih ulja pokazala je kako je sastav maslinovih ulja konstantan što se tiče vrste TAG (slika 8), a manje razlike su uočene u njihovom relativnom sadržaju. Ovakve fine analize razlika unutar iste skupine ulja moguće se isključivo uz statističku obradu podataka.

Analiza ulja metodom MALDI-TOF/MS omogućava reproducibilno prikupljanje i analizu profila TAG različitih biljnih ulja u kratkom roku što je pogodno za daljnju statističku analizu i formuliranje zaključaka o vrsti ulja i razlikama unutar grupe istih vrsta ulja.

5.2. Potpuna strukturna karakterizacija triacilglicerola na MALDI-SpiralTOF/TOF

Točna strukturna karakterizacija TAG iz različitih biljnih ulja u ovom radu s naglaskom na maslinovo ulje, provedena je na uređaju MALDI-SpiralTOF/TOF. MALDI-SpiralTOF/TOF selektivno prikuplja odabrane prekursor ione (Kubo i sur., 2013; Shimma i sur., 2012) što je preduvjet za potpunu strukturnu karakterizaciju TAG u biljnim uljima. MS spektar kod različitih biljnih ulja karakterističan je za vrstu ulja, a ovom se analizom željelo detaljnije ispitati koje su to točno vrste TAG prisutne, odnosno mogu li tako identificirani TAG biti dodatni pokazatelj vrste ulja. Također, uzeti su u obzir i različiti uzorci maslinovog ulja s obzirom na sortu i zemljopisno područje kako bi se pobliže istražio utjecaj tih varijabilnih okolišnih čimbenika na sastav TAG. Cjelovita strukturna karakterizacija je neophodan preduvjet za točniju identifikaciju TAG. Nomenklatura pojedinih produkt iona provedena je u skladu s prijašnjim istraživanjima i već definiranim oznakama: A-, B-, C-, E-, G- i J- tip iona (Cheng i sur., 1998; Pittenauer i Allmaier, 2009). Kod razvijanja metode ispitana je i osjetljivost instrumenta uz pomoć standarda TAG POL. Pokazalo se kako je limit detekcije kod načina rada CID 100 $\mu\text{l/ml}$. Dobiveni CID spektri koji sadrže produkt ione korišteni su za potpunu strukturnu identifikaciju. Princip strukturne identifikacije objašnjen je na primjerima iona m/z 901.7, 877.7 i 907.8. Na slici 9 prikazani su spektri s produkt ionima dobiveni fragmentacijom prekursor iona m/z 901.7 iz tri različita biljna ulja, maslinovog, suncokretovog i sezamovog ulja. U području spektra od 300 do 700 m/z vidljivi su te sukladno priznatoj nomenklaturi obilježeni produkt ioni potrebni za strukturnu identifikaciju. Najintenzivniji ioni su A-, B- i C- tip iona koji nastaju odvajanjem jednog masno kiselinskog ostatka iz strukture TAG. Ovi su ioni važni za određivanje broja ugljika, ali i razine nezasićenosti kod svakog pojedinog masno kiselinskog ostatka. S nešto manjim intenzitetom vidljivi su i ioni iz nižeg m/z dijela spektra označeni kao J- i G- tip iona koji su neophodni za točnu identifikaciju pozicijske distribucije pojedinih acil ostataka. Na temelju A-, B-, C-, G- i J- tipa iona vidljivo je da kod svih uzoraka ulja ion m/z 901.7 predstavlja TAG s tri linoleoil ostataka. No, prije konačnog zaključka potrebno je proučiti područje spektra od 650 do 890 m/z u kojem se nalaze ioni fragmenti nastali istovremenim cijepanjem na sva tri masno kiselinska ostatka pojedinih molekula vodika i ugljikovih atoma (slika 10). Naime ovo područje omogućava određivanje pozicije dvostruke veze unutar masno kiselinskih ostataka. Iz slike je vidljivo da se doista radi o linolenskoj masnoj kiselini

jer su najintenzivniji ioni nakon odvajanja dijela masno kiselinskog ostataka s dvostrukom vezom prisutni upravo u tom području spektra. Iako je u ovoj analizi bilo moguće odrediti točnu poziciju masne kiseline, to još uvijek predstavlja veliki izazov. Naime, točna identifikacija pozicije dvostruke veze u svim slučajevima nije bila moguća pogotovo ako se radilo o TAG koji sadrži različite masne kiseline po pitanju razine nezasićenosti. Sličan problem uočen je i u istraživanju Pittenauer i Allmaier (2009) gdje je određivanje pozicije dvostruke veze bilo moguće samo u slučaju kad je TAG sadržavao iste nezasićene masno kiselinske ostatke. U svim uzorcima biljnih ulja uspješno je provedena i detaljna strukturna karakterizacija iona pri m/z 877.7. U prijašnjim istraživanjima identificiran je kao TAG s jednim palmitoil ostatkom i dva linoleoil ostatka (Chapagain and Wiesman, 2009; Lay i sur., 2006). U CID spektru očekivano intenzitetom dominiraju ioni A-, B- i C- tipa. Kod uzorka maslinovog ulja produkt ioni A- tipa su m/z 693.6, 671.5, 669.6 i 667.7. B- tipu iona pripadaju ioni m/z 599.4, 597.7 i 595.45, dok C- tipu m/z 577.8, 575.8 i 573.4. Na temelju ovih fragmenata moguće je zaključiti kako ion m/z 877.7 kod uzorka maslinovog ulja čine dva TAG od kojih jedan ima jedan palmitoil ostatak i dva linoleoil ostatka dok drugi TAG ima po jedan palmitoil, oleoil i linoleoil ostatak. Točan razmještaj tih acil ostataka moguće je odrediti preko J- i G- tipa iona. Fragmenti masnih kiselina koji pripadaju G- tipu potvrdili su masne kiseline koje se nalaze na krajnjim pozicijama, palmitinsku, linolnu i linolensku. Naravno, točna identifikacija *sn*-1 i *sn*-3 distribucije nije moguća pošto se radi o analozima u steričkoj strukturi TAG. Zadnja potvrda pozicijske distribucije masno kiselinskih ostataka provedena je preko J- tipa iona. Naime J2 ioni koji ukazuju na *sn*-2 poziciju nalaze se pri m/z 329.1 i 331.2 što potvrđuje da se u ovom slučaju linoleoil i oleoil nalaze na središnjim pozicijama. Stoga se može zaključiti kako m/z 877.7 čine TAG identificirani kao PLL i POLn. Kod sezamovog ulja uočen je manji broj produkt iona nastalih fragmentacijom prekursor ion m/z 877.7 (slika 11). Interpretacijom A-, B- i C- iona pretpostavljeno je kako radi samo o TAG strukturi PLL. J2 ion pri m/z 329.2 ukazao je na to da se na središnjoj poziciji nalazi linoleoil ostatak, a dok G1/G3 ioni pri m/z 319.4 i 343.1 ukazuju na to da se na vanjskim pozicijama nalaze ostaci palmitoil i linoleoil. Kod suncokretovog ulja, tj. u CID spektru nastalom fragmentacijom iona m/z 877.7 uočen je još jedan dodatni J2 ion (slika 12). Taj dodatni J2 ion pri m/z 305.3 ukazuje na to kako se na *sn*-2 poziciji osim linoleoil ostatak nalazi palmitoil ostatak. Stoga u slučaju suncokretovog ulja TAG pri

m/z 877.7 čine pozicijski izomeri PLL i LPL. Kod prirodnih sjemenskih ulja zastupljenost palmitinske kiseline na poziciji *sn*-2 unutar TAG je veoma rijetka, te veća zastupljenost može ukazati na dodatak esterificiranih ulja (Bajoub i sur., 2018).

Kod prethodno opisanih MS analiza različitih maslinovih ulja identificirani su iste vrste TAG različite zastupljenosti (slika 8). Kako bi se ispitala veza pojedinih m/z vrijednosti i pripadajućih TAG provedena je i MS/MS analiza. Produkt spektar nastao fragmentacijom iona m/z 907.8 dva maslinova ulja različitih sorti prikazan je na slici 13. Iz spektra je vidljivo da se odmah mogu identificirati A-, B-, C-, G- i J- tipa ioni, a kod oba ulja radi se o TAG s tri oleoil ostatka (OOO). Strukturnom karakterizacijom TAG nisu uočene razlike u vrsti TAG kod uzoraka maslinovih ulja različitih sorti ili zemljopisne pripadnosti.

MS/MS analize pridonijele su točnijoj identifikaciji pojedinih TAG jer omogućavaju potpunu strukturnu karakterizaciju. Potrebno je napomenuti kako uspješnost strukturne karakterizacije pojedinog TAG izravno ovisi o selektivnom prikupljanju prekursor iona kako bi se osiguralo da svi produkt ioni u CID spektru pripadaju istom TAG. MALDI-SpiralTOF/TOF svojim tehnološkim rješenjem uspješno selektira pojedine prekursor ione što je potvrđeno i ovim istraživanjem.

5.3. Analiza masnih kiselina na GC-MS-u

Za analizu masnih kiselina iz maslinovog ulja testirana su dva pristupa pripreme uzorka. U sklopu ovog istraživanja razvijen je novi način pripreme metil estera masnih kiselina u analizi maslinovih ulja koji se temelji na transesterifikaciji s trimetilsulfonijevim hidroksidom (TMSH). TMSH je poznati, snažan derivatizacijski/transesterifikacijski reagens za analizu masnih kiselina uz pomoć GC. Tako su upoznate prednosti pripreme uzorka s TMSH brza reakcija i analiza uz neznatno narušavanje uzorka u fazi pripreme (Dron i sur., 2004). Drugi princip se bazirao na transesterifikaciji s metanolnom otopinom kalijevog hidroksida pri sobnoj temperaturi. Ova metoda pripreme metil estera masnih kiselina temelji se na službenoj metodi propisanoj za GC-FID analizu masnih kiselina u maslinovom ulju (IOC, 2015). U prvoj godini analize (uzorci iz 2014.) koristio se interni standard heptadekanska kiselina (C17:0) koji je u daljnjim analizama odbačen

stoga što se nije radila apsolutna kvantifikacija masnih kiselina, a u samim uzorcima maslinovog ulja uočena je njezina prisutnost. Priprema s TMSH bila je nešto brža ali jednako učinkovita kao i priprema s KOH. Jedini nedostatak ove pripreme mogao bi se vezati uz relativnu skupoću reagensa TMSH. Stoga je u drugoj godini analize masnih kiselina priprema metilnih estera provedena transesterifikacijom s metanolnom otopinom KOH. Analiza metil estera masnih kiselina provedena je na uređaju GC-MS. Na slici 14. prikazan je ukupni ionski kromatogram (TIC) uzorka maslinovog ulja. GC-MS tehnologija ima značajne prednosti u analizi metil estera masnih kiselina iz maslinovog ulja koje su uočene i tijekom izrade ovog rada. Osobito, uz identifikaciju analita pomoću standarda i njihovih retencijskih vremena, bilo je moguće provesti dodatnu potvrdu uz pomoć MS spektra, što značajno povećava razinu analitičke pouzdanosti. Dosadašnja istraživanja metil estera masnih kiselina na GC-FID nisu uzimala u obzir pozicijske izomere već su ih svrstavala u jednu komponentu čime se gubio dio važne informacije (Borges i sur., 2017; Kammoun i Zarrouk, 2012; Piscopo i sur., 2016). Na slici 15. prikazan je dobiveni maseni spektar metil estera oleinske kiseline u kojem dominiraju karakteristični ioni m/z 55, 69 i 97. Masenom spektrometrijom identificirali su se i svih prisutni metil esteri, a ne samo oni za koje postoje komercijalno dostupni standardi. U uzorcima maslinovih ulja strukturni izomeri masnih kiselina s 16C ili 18C atoma i jednom nezasićenom vezom, kromatografski su odvojeni te kasnije identificirani uz pomoć MS detektora. Potpuna strukturna karakterizacija i identifikacija svih metil estera masnih kiselina pokazala se kao neophodni korak za bolje razumijevanje sastava maslinovog ulja što je u skladu s zaključcima iz prijašnjih istraživanja (Laroussi-Mezghani i sur., 2015; Ollivier i sur., 2003).

5.4. Analitički parametri hrvatskih maslinovih ulja iz 2014. godine

Maslinarska godina 2014. okarakterizirana je kao loša godina za maslinarstvo zbog velikih količina oborina i većih napada bolesti i šetnika (Mesić i sur., 2015). To je bilo vidljivo i iz rezultata analiza uzoraka koji su prikupljeni za ovo istraživanje (tablica 7). Naime, od 24 uzoraka čak je 10 uzoraka pripalo kategoriji lampante (7 s Kvarnera, 2 iz Istre, 1 iz Dalmacije). Kategoriji djevičanska maslinova ulja pripao je jedan istarski i jedan kvarnerski uzorak, a kategoriji ekstra djevičanska

maslinova ulja 1 dalmatinski i ostalih 11 istarskih ulja. Većina uzoraka lampante ulja imala je visoke vrijednosti za sadržaj slobodnih masnih kiselina, peroksidni broj, K_{232} i K_{270} , što upućuje na hidrolitičko kvarenje zbog oštećenog ploda, ali i na oksidacijsko kvarenje ulja. U svim uzorcima dominira oleinska kiselina (C18:1 n9), a značajnije su još zastupljene palmitinska kiselina (C16:0) i linolna kiselina (C18:2n6) (tablica 8). Sukladno tomu u svim uzorcima ulja najzastupljeniji TAG je triolein (m/z 907.8), a zatim slijedi POO (m/z 881.8). Svi uzorci sadrže u značajnijim postocima i TAG POL (m/z 879.7) te LOO (m/z 905.8). Udio navedenih i ostalih TAG u hrvatskim uljima prikazan je u tablici 9.

5.5. Analitički parametri hrvatskih maslinovih ulja iz 2015. godine

U 2015. godini prikupljeno je 60 uzoraka od kojih je 52 pripalo kategoriji ekstra djevičanska maslinova ulja, 4 su svrstana u kategoriju djevičansko maslinovo ulje i 4 su maslinovo ulje lampante (tablica 10). Svi uzorci iz Istre su bili ekstra djevičanska maslinova ulja te veći broj uzoraka iz Dalmacije i Kvarnera dok je samo manji broj uzoraka pripadao kategorijama djevičanska maslinova ulja i maslinova ulja lampante. U hrvatskim ekstra djevičanskim uljima identificirano je 14 masnih kiselina: C16:0, C16:1 n-9c, C16:1 n-7c, C17:0, C17:1 n-7c, C18:0, C18:1 n-9c, C18:1 n-7c, C18:2 n-6c, C18:3 n-3c, C20:0, C20:1 n-9c, C22:0, C24:0 (tablica 11). Razlike u sastavu između ekstra djevičanskih ulja s različitih zemljopisnih područja primarno je vidljiva u sadržaju dominantne masne kiseline. Naime istarska ulja odlikuju se većim sadržajem oleinske kiseline ($74,12 \pm 1,26$ %), dok je njezin udio u dalmatinskim i kvarnerskim uljima niži. Za razliku od toga, linolna masna kiselina (C18:2n-6c) je bila u većem udjelu zastupljena u dalmatinskim i kvarnerskim ekstra djevičanskim maslinovim uljima. Dobiveni udjeli i zamijećena razlika između regija podudaraju se s prijašnjim istraživanjima (Jukić Špika i sur., 2013; Koprivnjak i sur., 2012; Zanetic i sur., 2007). No, Koprivnjak i sur. (2012) zamjećuje i razlike u sadržaju ovih masnih kiselina u ovisnosti o sorti maslina i godini proizvodnje maslinovog ulja te stoga zaključuje da se veća zastupljenost pojedinih masnih kiselina ne može pripisati samo regionalnom utjecaju. I u ovom istraživanju je potvrđen višestruki utjecaj na sastav masnih kiselina koji se treba uzeti u obzir kod zemljopisne karakterizacije maslinovih ulja. Nadalje, zanimljivo je i promotriti odnos između svih

jednostruko nezasićenih (MUFA, od engl. *monounsaturated fatty acids*) i višestruko zasićenih masnih kiselina (PUFA, od engl. *polyunsaturated fatty acids*). Istarska ulja imaju veći omjer MUFA/PUFA koji u prosjeku iznosi $11,42 \pm 1,42$, dok je kod kvarnerski i dalmatinskih ulja taj omjer niži i iznosi $7,93 \pm 1,38$ te $7,43 \pm 1,68$. Razlike između omjera MUFA/PUFA s obzirom na regionalnu pripadnost ulja zamijećene su i za omjer oleinske i linolne kiseline.

U ekstra djevičanskim uljima iz 2015. godine je uz pomoć MALDI-TOF/MS identificirano 11 triacilglicerola, tj. natrijevih adukta triacilglicerola: PLP (m/z 853.7), POP/PPO (m/z 855.7), PLL (m/z 877.7), POL (m/z 879.7), POO (m/z 881.8), POS (m/z 883.8), LLL (m/z 901.7), LLO/LOL (m/z 903.7), LOO (m/z 905.8), OOO (m/z 907.8) i SOO (m/z 909.8). Iz tablice 11 vidljivo je kako u svim uzorcima dominira TAG s tri oleinska ostatka iako se njegov postotni udio razlikuje s obzirom na zemljopisno područje maslinovih ulja sukladno prethodnim zapažanjima za oleinsku kiselinu. Naime, OOO čini čak $43,80 \pm 3,30$ % ukupnog sadržaja svih TAG, dok je kod dalmatinskih uzoraka taj postotak niži i iznosi $40,39 \pm 2,29$. Uzorci s Kvarnera sadrže najmanje OOO i to samo $37,38 \pm 2,92$ %. TAG s tri linolna ostatka pronađen je samo u uzorcima iz Dalmacije i Kvarnera, ali u vrlo malom postotnom udjelu.

5.6. NIRS analiza maslinovih ulja

Rezultati NIR spektroskopske analize maslinovih ulja prikazani su na slici 16. U području od 400 do 2500 nm vidljivo je kako maslinovo ulje ima nekoliko regija s intenzivnijim signalom. Za istraživanje zemljopisnog područja uzeto je samo NIR područje od 1000 do 2222 nm jer se pokazalo najinformativnije za istraženu problematiku što je već potvrđeno u literaturi (Casale i sur., 2012; Oliveri i sur., 2011; Woodcock i sur., 2008). Uključivanje područja od 2222 nm do 2500 nm u analizu nije se pokazalo korisnim što je možda rezultat prezasićenosti spektra u tom području. Na slici 17 prikazani su NIR spektri maslinovih ulja od 1000 do 2222 nm. Svi ispitani uzorci maslinovih ulja imaju vrlo slične NIR spektre u kojima se može identificirati nekoliko važnih regija. Regija od 1150 do 1250 nm koja je odraz drugog preklapanja C-H vibracijskih rastezanja ima maksimum pri 1168 i 1215 nm. Područje od 1650 do 1850 ima apsorpcijske maksimume pri

1725 i 1762 nm, a rezultat je prvog preklapanja C-H vibracijskih rastezanja (Woodcock i sur., 2008). Usporedbom spektara maslinovih ulja vidljiva je tek neznatna razlika u apsorbanciji, što potvrđuje nezaobilaznu ulogu statističke obrade podataka u daljem istraživanju zemljopisne pripadnosti maslinovih ulja.

5.7. Mogućnosti analitičkih metoda u kombinaciji s kemometrijom u otkrivanju autentičnosti maslinovih ulja

Autentični proizvod je onaj koji je u skladu s deklaracijom koju je dao proizvođač u pogledu sastojaka, izostanka štetnih tvari, tehnologije proizvodnje, zemljopisnog i botaničkog porijekla, godine proizvodnje i ostalih definiranih karakteristika (Ashurst i Dennis, 1996). Kako bi se bolje opisali uzorci korištenjem analiziranih komponenti te kako bi se utvrdila njihova eventualna povezanost sa zemljopisnim podrijetlom maslinovog ulja provedena je statistička obrada podataka metodama PCA i PLS-DA.

5.7.1. Analize uzoraka iz 2014. godine metodom PCA

Uzorci su dodatno statistički obrađeni metodom glavnih komponenti (PCA) kako bi se utvrdio utjecaj različitih varijabli na grupiranje uzoraka, tj. kako bi se identificirao obrazac iz eksperimentalnih podataka. PCA omogućava proučavanje međusobne povezanosti izvornih varijabli te se izvodi zajednička dimenzija uzduž koje se klasificiraju varijable i prema tim varijablama prikazuju uzorci kroz 2D grafički prikaz. Projekcija izvornih varijabli odnosno njihovih PC opterećenja i vrijednosti svakog uzoraka za glavnu komponentu u prostoru glavnih komponenta (PC1 i PC2) omogućava dvodimenzionalnu vizualizaciju odnosa između izvornih varijabli i načina na koji utječu na razlike ili sličnosti među uzorcima. Kao varijable su u ovom radu prikazanoj analizi korišteni udjeli pojedinačnih masnih kiselina ili TAG te NIR spektri u području od 1000 do 2222 nm, a kao slučaj korišteni su uzorci ekstra djevičanskih maslinovih ulja. Rezultati su prikazani kao projekcije varijabli i uzoraka u prostoru glavnih komponenti. U 2D grafičkom prikazu grupiranje uzoraka se promatralo prema regionalnoj pripadnosti Istri, Kvarneru ili

Dalmaciji. Najprije su provedene preliminarne analize na uzorcima iz 2014. godine kako bi se ispitao utjecaj analiziranih parametara. No, pošto su uzorci različitih kategorija nejednako distribuirani unutar zemljopisnih grupa pri interpretaciji rezultata ne mogu se linearno izvesti konačni zaključci. PCA analiza s uzorcima iz 2014. godine pokazala je povezanost zemljopisno područje sa sastavom masnih kiselina, TAG i NIR spektrom. Naime, došlo je do grupiranja uzoraka na temelju njihove zemljopisne pripadnosti, što je dobro vidljivo u analizama gdje su se kao varijable koristili udjeli pojedinačnih masnih kiselina ili TAG. Prve dvije glavne komponente (PC1 i PC2) u analizi s masnim kiselinama kao varijablama, opisuju ukupno 53 % varijabilnosti (slika 18a). Na slici 18b prikazani su uzorci u prostoru tih glavnih komponenta. Vidljivo je kako je došlo do grupiranja uzoraka s područja Istre uzduž pozitivne strane osi PC1 i PC2. Većina uzoraka sa Kvarnera nalazi se na negativnoj strani osi PC1 i PC2, a uzorci iz Dalmacije uzduž negativne strane PC1 i pozitivne strane osi PC2. Uzorci iz Istre, s obzirom na njihov razmještaj s pozitivne strane PC1 osi, okarakterizirani su većim sadržajem C16:0, C16:1 n-7c i C18:1 n-7c, dok su kvarnerska ulja okarakterizirana većim udjelom C18:2 n-6c, C20:1 n-9c i C18:3 n-3c. Kada su se kao varijable koristili TAG, PC1 i PC2 opisuju ukupno čak 73 % varijabilnosti (slika 19a). Uzorci u prostoru PC1 i PC2 razdvajaju se prema zemljopisnom podrijetlu iako granice između grupa nisu jasne (slika 19b). Istarski uzorci smješteni su uzduž pozitivne strane osi PC1, kvarnerski uzorci uzduž negativne strane osi PC1, a dalmatinski uzorci uzduž pozitivne strane osi PC2. Kvarnerske uzorke karakterizira veći udjel TAG m/z 905.8, 903.7, 877.7, 879.7 i 901.7 dok istarska ulja imaju veći udjel TAG s m/z 881.8, 855.7 i 907.8. Zadnja PCA analiza koja je provedena na uzorcima iz 2014. godine uzimala je u obzir varijable NIR spektara (slika 20a). Sažetak ukupnih varijacija predstavljen je u prve dvije glavne komponente koje zajedno objašnjavaju 52 % varijance rezultata. Na slici 20b vidljivo je kako su se uzorci iz Istre i Kvarnera razdvojili uzduž osi PC1, dok se to nije dogodilo za dva uzorka iz Dalmacije.

Analize uzoraka iz 2014. godine metodom PCA ukazuju na tendenciju grupiranje uzoraka po zemljopisnom području. Međutim, nije moguće kvalitetno procijeniti koja od kemijskih analiza najbolje razdvaja uzorke iz različitih regija, a spaja one iz iste regije. Stoga je u sljedećoj godini istraživanja potrebno prikupiti veći broj uzoraka jednake kvalitete.

5.7.2. Analize uzoraka iz 2015. godine metodom PCA

U statističkoj obradi PCA uzoraka iz 2015. uzeti su samo uzorci koji pripadaju kategoriji ekstra djevičansko maslinovo ulje kako bi se izbjeglo grupiranje uzoraka na temelju kategorije ulja. Povezanost kategorije ulja i udjela glavnih komponenti ispitan je analizom varijanci (ANOVA). Analizom varijanci (tablica 12) utvrđena je statistički značajna razlika na razini $p \leq 0,05$ u udjelu TAG SOO, a na razini $p \leq 0,01$ u udjelu PLL i POL s obzirom na kategoriju ulja. Također, utvrđena je statistički značajna razlika na razini $p \leq 0,001$ u udjelu LLL i LLO/LOL između kategorija ulja. Povezanost kategorije ulja, tj. oksidacijske degradacije sa sastavom glavnih komponenta ulja pokazan je u prijašnjim istraživanjima (Gómez-Alonso i sur., 2004). Rezultati metode ANOVA nam potvrđuju dosadašnje spoznaje, stoga su se za daljnji razvoj statističkih modela za zemljopisnu karakterizaciju ulja koristili samo uzorci koji pripadaju kategoriji ekstra djevičanskih ulja. Uzorci koji pripadaju kategorijama djevičansko maslinovo ulje i lampante nisu se koristili u kreiranju kalibracijskih modela.

Za analizu PCA uzoraka iz 2015. godine kao varijable su se koristili udjeli pojedinačnih masnih kiselina ili TAG te NIR spektar u području od 1000 do 2222 nm. Sve provedene analize ukazuju na to da zemljopisno podrijetlo maslinovog ulja ima utjecaj na analizirane parametre. Prve dvije glavne komponente iz PCA analize s masnim kiselinama kao varijablama opisuju ukupno 43 % varijabilnosti (slika 21a). Promatranjem uzoraka u koordinatnom sustavu tih dvaju glavnih komponenti moguće je zamijetiti blago grupiranje prema zemljopisnom području iako jasne granice između tih uzoraka nisu vidljive (slika 21b). Naspram tomu, analiza s TAG daje PC1 koji objašnjava 45 % ukupne varijance, a PC2 22 % ukupne varijance čime one zajedno opisuju 67 % varijabilnosti (slika 22a). Iz slike 22b vidljivo je kako uzorci u prostoru glavnih komponenti pokazuju intenciju jasnog grupiranja prema zemljopisnom području. Na pozitivnoj strani uzduž osi PC1 i PC2 smjestili su se uzorci iz Dalmacije, dok su uzorci s Kvarnera smješteni uzduž pozitivne strane osi PC1 i negativne strane osi PC2. Naspram tomu, uzorci iz Istre smješteni su uzduž negativne strane PC1 i grupirani su u malom prostoru. Istarski uzorci su okarakterizirani većim udjelom TAG m/z 907.8 i 881.8, kvarnerska ulja većim udjelom TAG s m/z 855.7, 853.7, 879.7, a uzorci dalmatinskih ulja s TAG m/z 905.8 i 903.7. Kod PCA provedene s NIR spektrima, prve dvije

glavne komponente opisuju 43 % varijabilnosti (slika 23a). Uzorci u prostoru tih dviju glavnih komponenti su raspršeni, ali imaju tendenciju grupiranja prema zemljopisnom području. Usprkos evidentnom grupiranju istarskih uzoraka uzduž pozitivne strane osi PC1, jasno odvajanje ostalih uzoraka smještenih na negativnoj strani osi PC1 nije vidljivo, ponajprije zbog prevelike raspršenosti kvarnerskih uzoraka (slika 23b).

Analiza PCA s uzorcima iz 2015. godine pokazala je veliki potencijal TAG kao komponenti bitnih za zemljopisnu karakterizaciju maslinovih ulja, ali i kao biomarkera regionalne pripadnosti.

5.7.3. Analiza PLS-DA

Metoda PLS-DA je korištena za kreiranje linearno regresijskog odnosno predikcijskog modela za praćenje zemljopisnog podrijetla hrvatskih ekstra djevičanskih maslinovih ulja. Hipoteza je bila da je uz pomoć takvih modela moguće odrediti dolazi li uzorak maslinovog ulja iz Hrvatske s područja Istre ili ne. U tu su svrhu uzorci podijeljeni u dvije grupe: istarski uzorci i svi ostali, ne-istarski uzorci. Pošto se razvijanje metoda i koncepta prvenstveno temeljilo na istarskim uzorcima, ovom analizom se posebno željelo ispitati grupiranje s obzirom na pripadnost ili nepripadnost istarskom području. U grupu „ne-istarsko“ stoga su uvršteni uzorci s područja Kvarnera i Dalmacije. Za uspješnu implementaciju metode PLS-DA koja bi se mogla koristiti za klasifikaciju ulja u ove dvije zemljopisne pripadnosti, u budućnosti će biti potrebno prikupiti puno veći broj uzoraka iz navedenih područja čime će se povećati pouzdanost analize i klasifikacije.

U ovom je radu napravljeno nekoliko kalibracijskih modela koji su uzimali u obzir različite grupe analiziranih komponenti. Kao X varijable uzeti su parametri „sastav masnih kiselina“, „sastav TAG“, „sastav masnih kiselina i TAG“, „NIR spektar“ i „odabrane varijable iz NIR spektra“. Varijable Y koje su se predviđale modelom su bile dvije zemljopisne pripadnosti nazvane Istra i ne-Istra. Uzorci su grupirani u ove dvije grupe binarnim sustavom, tj. uzorci su kodirani s 1 ili 0 ovisno da li pripadaju ili ne pripadaju grupi.

Kod izrade kalibracijskog modela ključno je odabrati broj faktora ili latentnih varijabli. Odabir optimalnog broja faktora temeljio se na dijagnostičkom testu koji pokazuje kako se korijen

srednje kvadratne pogreške križne validacije (RMSECV, od engl. *root mean square error of cross-validation*) mijenja s povećanjem broja faktora. Faktor koji se koristio u izradi svakog pojedinog modela odabran je na temelju najmanje vrijednosti RMSECV. Faktori predstavljaju nezavisne izvore varijacija u podacima, a rangiraju se prema količini varijacija koje opisuju. Dakle, prvi faktor je izvor većine varijacija, a svaki dodatni opisuje preostale varijacije. Zato je kod odabira faktora bitno da se uzme čim manji (Martinović i sur., 2012). Na slici 24 je prikazana ovisnost varijance Y varijabli o broju faktora kod određivanja zemljopisnog područja uz pomoć odabranih varijabli iz NIR područja, a najveća vrijednost krivulje prije postizanja platoa ukazuje na optimalni broj faktora za dotični model. Broj faktora (latentnih varijabli) odabranih u svakom modelu prikazan je u tablici 13 zajedno s ostalim rezultatima kalibracijskih modela za određivanja zemljopisnog područja. Kalibracijski parametri PLS-DA koji su se uzeli u obzir su koeficijenti determinacije te korijen srednje kvadratne pogreške kalibracije i križne validacije (RMSEC i RMSECV). U validaciji modela koristila se tehnika križne validacije koja svaki kalibracijski uzorak uzima kao da je validacijski. Dobiveni kalibracijski parametri su ponajprije indikatori korelacije između izmjerenih vrijednosti i vrijednosti dobivenih modelom, dok su validacijski parametri bolji indikatori točnosti modela. Naime, kalibracijski podaci se koriste u samoj izradi modela, a validacijski za njegovu provjeru (Martinović i sur., 2012). Stoga se procjena kvalitete modela prvenstveno temeljila na parametrima iz križne validacije.

Model PLS-DA temeljen na NIR spektru pokazao je najbolju korelaciju između stvarnih vrijednosti i vrijednosti dobivenih modelom ($R^2c=0,96$, $RMSEC=0,093$). No, parametri križne validacije bili su lošiji, tj. R^2cv je iznosio 0,69, dok je RMSECV imao vrijednost 0,277. Odstupanje u ovim parametrima između kalibracije i križne validacije može ukazivati na problem „overfitting“, tj. model je previše prilagođen podacima iz kalibracijskog skupa. U ovoj analizi korišten je samo dio NIR spektralnog područja od 1000 do 2222 nm. Za konstruiranje modela testirana su različita područja NIR spektra uključujući i cjelokupno NIR područje. Međutim, najbolji rezultati dobiveni su ako se koristilo samo suženo područje bez dijelova koji ne sadrže spektralne podatke. Ovaj model koristio se i za daljnje određivanje važnih varijabli iz NIR spektra kako bi se kreirao novi model PLS-DA veće točnosti. Odabir važnih varijabli temeljio se na statističkoj značajnosti regresijskog koeficijenta (slika 25). Regresijski koeficijent pokazuje kako jedinična promjena

vrijednosti nezavisne varijable X utječe na mijenjanje vrijednost zavisne varijable Y (Dupuy i sur., 2010). Takav novi model PLS-DA koji se temelji samo na važnim varijablama iz NIR spektra dao je veću vrijednost R^2_{cv} 0.88 i manji RMSECV (0,175) što ukazuje na model veće točnosti usprkos neznatno lošijim kalibracijskim parametrima ($R^2_c=0,93$, RMSEC=0,128). Modeli PLS-DA u kojem su kao nezavisne varijable X uzete masne kiseline ili TAG imali su nešto lošije izlazne parametre, iako se model PLS-DA temeljen na sastavu TAG može smatrati uspješnim s obzirom na vrijednosti R^2_{cv} 0,71 i RMSECV 0,273. U ovom istraživanju sadržaj masnih kiselina u uzorcima ulja pokazao se kao najlošiji pokazatelj zemljopisne pripadnosti ulja ($R^2_{cv}=0,50$, RMSECV=0,366). Nadalje, ispitana je i mogućnost kombiniranja sadržaja TAG i masnih kiselina kao varijabli u modelu PLS-DA. Međutim, model je pokazao lošije rezultate nego model PLS-DA u kojem su korišteni samo TAG što ponovno potvrđuje malu informativnu vrijednost masnih kiselina po pitanju zemljopisnog područja. Ovaj model je ipak ukazao na to koje specifične masne kiseline i TAG najviše pridonose razlikovanju između dvije zemljopisne grupe (slika 26). Masne kiseline koje su bile identificirane kao važne varijable su oleinska i linolna kiselina, dok su među TAG to bili OOO, LOO, POL, PLL, LLO/LOL, POO.

Dva PLS-DA modela s najboljim parametrima kalibracije i križne validacije su dobivena u slučaju kad su se koristile varijable TAG ili važne varijable NIR spektra.

5.7.3.1. Testiranje PLS-DA modela vanjskim validacijskim setovima

Kalibracijski modeli PLS-DA s najboljim parametrima testirani su na novim setovima maslinovih ulja koji nisu bili uključeni u kalibraciji i stoga čine vanjski validacijski set. Prvi set činilo je 11 uzoraka maslinovog ulja iz iste godine berbe (2015. godine) koji su slučajno odabrani, od čega 7 dolazi s istarskog područja dok preostala 4 hrvatska uzoraka ne pripadaju tom području. Iz svake grupe dva uzorka su komercijalno nabavljena i nemaju sigurnu potvrdu zemljopisnog područja iako je ono naznačeno na deklaraciji proizvoda. U tablici 14 su prikazane vrijednosti dobivene modelima te referentne Y vrijednosti za svaki pojedini uzorak iz vanjskog validacijskog seta. Dobiveni su vrlo slični rezultati bez obzira da li se radilo o modelu PLS-DA u kojem su X varijable

TAG ili važne varijable NIR spektra. Svi osim jednog uzorka su točno klasificirani. Dalmatinski uzorak je krivo klasificiran kao istarski, no ovaj uzorak pripada komercijalnim uzorcima te se njegova zemljopisna pripadnost ne može u potpunosti potvrditi. Uzimajući u obzir česte prijevare na tržištu po pitanju netočnog deklariranja zemljopisnog podrijetla potrebno je vrlo oprezno interpretirati rezultate analize komercijalnih uzoraka. No, ovi rezultati zasigurno pokazuju kako ovakvi modeli uz baze podataka sa većim brojem uzoraka različitih podrijetla i godišta mogu biti korisni za kontrolu maslinovih ulja na tržištu.

Modeli su testirani i na setu uzoraka iz godine berbe 2014. kako bi se ispitala stabilnost modela PLS-DA s obzirom na godinu proizvodnje maslinovog ulja. No, prije analize PLS-DA provedena je i analiza PCA sa svim uzorcima iz 2014. i 2015. godine (n=84) kako bi se provjerila prirodna intencija grupiranja uzoraka. Na grafu PCA (slika 27) dobivenom u analizi gdje su varijable bili udjeli TAG vidljivo je kako su uzorci s istog područja, ali različitih godina proizvodnje, smješteni unutar istog područja. Međutim, jasne granice između kvarnerskih i dalmatinskih uzoraka nisu vidljive. Treba uzeti u obzir da kvarnerski i dalmatinski uzorci pripadaju i različitim kategorijama ulja što moguće doprinosi raspršenju.

Kalibracijski modeli kreirani s uzorcima EDMU iz 2015. testirani su sa novim vanjskim validacijskim setom uzoraka iz 2014. koji pripadaju kategorijama EDMU/MU. U ovom slučaju vanjski validacijski set činilo je 14 uzoraka iz Istre, i 2 uzorka koja nisu iz Istre (po jedan kvarnerski i dalmatinski). U tablici 15 prikazane su dobivene vrijednosti i referentne Y vrijednosti za svaki pojedini uzorak iz vanjskog validacijskog seta. I kod ovog vanjskog validacijskog seta su dobiveni vrlo slični rezultati bez obzira radilo se o modelu PLS-DA u kojem su X varijable TAG ili važne varijable NIR spektra. Svi istarski uzorci su točno klasificirani kao i jedan kvarnerski, dok je dalmatinski uzorak krivo klasificiran kao istarski.

Primjenjivost kalibracijskih modela na uzorcima iz različitih godina proizvodnje testirana je i na maslinovim uljima s godinom proizvodnje 2013. Šest uzoraka iz Istre koji su uvedeni u istraživanje tijekom postupka razvijanja metode nabavljeni su od provjerenih proizvođača, a na temelju deklaracije kategorizirani su kao EDMU. U tablici 16 prikazane su vrijednosti dobivene kreiranim modelima kao i referentne Y vrijednosti za svaki pojedini uzorak iz 2013. godine. Modeli PLS-DA

u kojem su X varijable TAG ili važne varijable NIR spektra, točno su klasificirali većinu istarskih uzoraka, iako se kod modela s varijablama TAG za jedan uzorak dobila granična vrijednosti (1,5). Nažalost zbog pomanjkanja EDMU/DMU uzoraka iz Kvarnera ili Dalmacije nije bilo moguće u većem obujmu ispitati primjenjivost modela na ne-istarskim uzorcima. Stoga se može zaključiti kako su modeli kreirani sa uzorcima iz 2015. godine primjenjivi za provjeru zemljopisnog podrijetla EDMU iz Istre različitih godina proizvodnje.

U sklopu istraživanja ispitala se i primjenjivost modela na uzorke koji nisu iz Hrvatske. Iako ovaj model nije kreiran da prepozna tu kategoriju ulja zanimljivo je ispitati kako se ti uzorci kategoriziraju. Prikupljena su 3 uzoraka iz Italije, jedan iz Bosne i Hercegovine i jedan deklariran kao maslinovo ulje EU podrijetla godine proizvodnje 2014. ili 2015., a svi su kategorizirani kao EDMU. U ovom slučaju modeli PLS-DA u kojem su X varijable TAG ili važne varijable NIR spektra nisu bili uspješni u klasificiranju. Uzorke nisu razvrstali izvan kategorija već su ih prepoznali kao istarske ili ne istarske. Na slici 28 prikazana je projekcija tih uzoraka u PCA grafu koji je dobiven analizom uzoraka iz 2015. godine odnosno njihovog sadržaja TAG. Premda se nisu smjestili unutar pojedinih grupa, ne-hrvatski uzorci nisu se jasno izdvojili od hrvatskih uzoraka što objašnjava neuspješnu klasifikaciju.

5.7.4. Baza rezultata molekularnih profila hrvatskih maslinovih ulja

Jedan od ciljeva istraživanja bio je i dobivene podatke objediniti u sveobuhvatnu bazu rezultata kako bi se stvorili temelji za izradu buduće online baze podataka molekularnih profila hrvatskih ulja. S obzirom na ograničena saznanja o utjecaju pojedinih područja Hrvatske na sastav maslinovih ulja javila se velika potreba za objedinjenjem dosadašnjih znanstvenih istraživanja. Odnedavno u Hrvatskoj postoji online baza podataka CROLIVE koja sadrži mikrosatelitne profile značajnijih hrvatskih sorti maslina. Baza podataka s usklađenim genetskim profilima po prvi put daje uvid u biološku raznolikost sorti maslina koje su prisutne u Hrvatskoj (Poljuha, 2017). Međutim, još uvijek nema jedinstvene baze molekularnih podataka hrvatskih maslinovih ulja koja će omogućiti brzu i pouzdanu provjeru autentičnosti maslinovih ulja na tržištu. U svijetu trenutno postoji 15 baza podataka maslina i maslinovih ulja, od kojih je 10 dostupno online, a u čijoj izradi prednjače zemlje koje su veliki proizvođači maslinovog ulja. Većina baza objedinjava morfološke

karakteristike i DNK molekularne markere, a tek nekoliko njih sadrži i kemijski sastav i senzorske karakteristike maslinovih ulja. Jedan od boljih primjera za takve baze je Talijanska nacionalna baza ekstra djevičanskih maslinovih ulja s oznakom izvornosti/zemljopisnog podrijetla koja osim kemijskog sastava sadrži izotopsku i metabolomsku karakterizaciju maslinovih ulja (OLEUM consortium, 2017). Ovaj tip baze je neophodan za prepoznavanje specifičnosti maslinovih ulja iz pojedinih zemljopisnih područja i stvaranje prepoznatljivosti na globalnom tržištu. Rezultati svih analiza dobivenih u ovom doktorskom istraživanju na hrvatskim maslinovim uljima ujedineni su u bazu rezultata i mogli bi se koristiti za kreiranje baze podataka s kemijskim karakteristikama hrvatskih maslinovih ulja šire dostupnosti. Naravno, kako bi se to ostvarilo potrebno je sustavno ponavljanje analiza kroz veći broj godina na značajnom broju uzoraka maslinovih ulja koji kvalitetno pokrivaju sve sorte i regije Hrvatske te se vežu i uz parametre vrste zemljišta, klime i genetskih osobina maslina. Također, analizom PLS-DA kreirane su ciljane baze rezultata koje imaju veliku potenciju u kontroli zemljopisnog podrijetla hrvatskih maslinovih ulja, a čijom bi se nadogradnjom s provjerenim uzorcima maslinovih ulja omogućila šira primjenjivost u provjeri autentičnosti maslinovih ulja na tržištu.

5.8. Mogućnosti MALDI-TOF analize u određivanju krivotvorenja

Kako bi se jasnije ispitale mogućnosti analize TAG profila uz pomoć metode MALDI-TOF u otkivanju krivotvorenja, provedena je i usporedna spektrofotometrijska analiza u UV području. Spektrofotometrijskom analizom u UV području određuje se prisutnost produkta oksidacije koji su pokazatelji kvalitete ulja, ali i njegove autentičnosti. Naime, konjugirani dieni i trieni nastaju i tijekom procesa rafinacije pa se dodatak rafiniranih ulja u ekstra djevičansko ulje može zamijetiti upravo prema njihovom povećanom sadržaju (Koprivnjak, 2006). Pošto je to danas zakonski propisana metoda u analizi ulja upravo se na taj način najčešće otkivaju krivotvorenja maslinovog ulja sa sjemenskim uljima poput jestivog suncokretovog ulja ili rafiniranim maslinovim uljima. U istraživanju koji su proveli Škevin i sur. (2011) najveći potencijal među zakonski propisanim pokazateljima (sastav masnih kiselina, udio trans masnih kiselina, udio voskova i K-brojevi) u otkrivanju dodatka veoma malih količina rafiniranih ulja u ekstra djevičanskom maslinovom ulju

pokazao je ΔK . K_{232} , K_{270} i ΔK određeni su za ekstra djevičansko maslinovo ulje Id23, jestivo suncokretovo ulje S, maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja R i krivotvorine (R1, R10, R20, S1, S10 i S20), a dobivene vrijednosti prikazane su u tablici 17. Analitički dobivene vrijednosti uspoređene su sa zakonski propisanim graničnim vrijednostima za kategoriju EDMU. Na slici 29a vidljivo je da se mjerenjem K_{232} može detektirati tek dodatak krivotvorine od 20 % ili više S u Id23, dok dodatak R ne utječe značajno na promjenu K_{232} vrijednosti. K_{270} uspješno je korišten za detekciju dodatka krivotvorine od 10 % ili više R i S u Id23 (slika 29b). Graničnu vrijednost ΔK su prelazili uzorci R20, R i S (slika 29c) što ukazuje na to kako se ovim parametrom može detektirati tek dodatak 20 % ili više R. U ovom istraživanju najuspješniji pokazatelj krivotvorenja bio je K_{270} s dobrom osjetljivošću na krivotvorine dodatkom 10 % rafiniranih ulja u EDMU. No, dodatak vrlo malih količina S i R u Id23 nije bilo moguće detektirati pomoću spektrofotometrijske analize u UV području, odnosno graničnih vrijednosti za K-brojeve.

Analiza MALDI-TOF/MS je pokazala kako se sastav TAG značajno razlikuje između ekstra djevičanskog maslinovog ulja Id23, jestivog suncokretovog ulja S i maslinovog ulja sastavljenog od rafiniranog ulja i djevičanskih maslinovih ulja R (slika 30). Razlika je posebno vidljiva u intenzitetu pojedinih TAG, a pojedini TAG su zastupljeni samo u pojedinim vrstama ulja (tablica 18). U ekstra djevičanskom maslinovom ulju očekivano dominiraju TAG koji u svom sadržaju imaju oleinski ostatak, a to su OOO i POO. OOO čini čak 43,21 % ukupnog sadržaja TAG, dok POO čini 32.19 %. Suncokretovo ulje karakterizira drugačiji TAG profil s najintenzivnijim ionima pri m/z 901.7, 903.7 i 905.8 identificiranih kao LLL, LLO/LOL i LOO. Suncokretovo ulje za razliku od maslinovog ima više TAG koji u svom sastavu sadrže polinezasićenu linolnu kiselinu. Triacilglicerol LLL nije pronađen u analiziranom ekstra djevičanskom uzorku maslinovog ulja Id23. Maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranog ulja i djevičanskih maslinovih ulja R sadrži TAG LLL, a osim njega spektrom dominiraju ioni koji pripadaju LLO/LOL, LOO i OOO. Posebno je zanimljivo promotriti kako dodatak suncokretovog ulja ili maslinovog ulja sastavljenog od rafiniranog ulja i djevičanskih maslinovih ulja u ekstra djevičansko maslinovo ulje utječe na sastav pojedinih TAG (slika 31 i 32). U oba slučaja dodatak već 1 % drugog ulja u Id23 vidljiv je kroz promjenu sastava TAG, iako se trend pada ili porasta pojedinog TAG bolje zamjećuje nakon dodatka 10 % drugog ulja. Naime,

sadržaj pojedinog TAG izražen je kao relativni postotak, pa se promjene u sadržaju pojedinog TAG odražavaju na zastupljenost ostalih TAG. Kod dodatka 10 % obje vrste ulja u ekstra djevičansko ulje dolazi do pada sadržaja TAG karakterističnih za maslinovo ulje, a raste zastupljenost TAG koji u svom sastavu imaju linolni ostatak. Iz slika 31 i 32 vidljivo je kako je sadržaj LLL (m/z 901.7), LLO/LOL (m/z 903.7) i LOO (m/z 905.8) kod uzorka koji sadrže 10 % drugog ulja R10 i S10 znatno veći nego kod čistog ekstra djevičanskog ulja Id23. To se dobro vidi kod TAG pri m/z 901.7 kojeg ni nema u čistom ekstra djevičanskom ulju. Naravno, kod uzorka koji imaju u svom sastavu 20 % drugog ulja R20 i S20 porast ovih TAG je još izraženiji. Nasuprot tomu, dodatak drugih ulja u Id23 utječe na manju zastupljenost OOO i POO. I u ovom slučaju, njihova zastupljenost pada s većim dodatkom drugih ulja. Iako ovaj grafički prikaz ukazuje na znatne promjene u sastavu kod dodatka jestivog suncokretovog ulja i maslinovog ulja sastavljenog od rafiniranog ulja i djevičanskih maslinovih ulja u ekstra djevičansko maslinovo ulje, statistička obrada podataka nužna je kako bi se pobliže ispitala granica do koje se može detektirati krivotvorenje. S tom namjerom provedena je analiza metodom glavnih komponentata (PCA) u kojoj su slučajevi uzorak ekstra djevičanskog maslinovog ulja Id23 i njegove krivotvorine, a varijable udjeli pojedinih TAG. Projekcija varijabli u prostoru glavnih komponenti PC1 i PC2 je prikazana na slici 33, a projekcija uzoraka na slici 34. Prve dvije komponente zajedno opisuju 88,21 % varijabilnosti, tj. PC1 pridonosi 77,59 % dok PC2 pridonosi 10,62 % ukupnoj varijanci. Iz grafa je vidljivo kako je došlo do razdvajanja uzoraka prema njihovoj čistoći odnosno prisutnosti krivotvorenja. Naime, čisti uzorak ekstra djevičanskog ulja Id 23 se sasvim izdvojio od uzoraka koji su krivotvoreni S1, S10, S20, R1, R10 i R20. Iako su svi smješteni uzduž negativne strane PC1 osi, Id23 se nalazi uzduž pozitivne strane PC2 osi, a krivotvoreni uzorci uzduž negativne strane PC2 osi. Nasuprot tomu, uzorci ulja koji su u ovom istraživanju bili izvor krivotvorenja S i R nalaze se na pozitivnoj strani uzduž PC1 osi. Naime, izvor krivotvorenja S i R sadrže visoke udjele spojeva koji pozitivno koreliraju s PC1, a čisto ulje i njegove krivotvorine visok udjel spojeva koji negativno koreliraju s PC1. Usporedbom pozicije varijabli i uzoraka vidljivo je kako su m/z 879.7, 877.7, 901.7, 903.7 i 905.8 karakteristični za izvore krivotvorenja.

Kako bi se potvrdili rezultati provedeno je 1 % krivotvorenje na većem broju EDMU uzoraka iz Istre. U 9 uzoraka iz istog područja kao i u početni uzorak Id23 dodano je 1 % jestivog

suncokretovog ulja ili maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranog ulja i djevičanskih maslinovih ulja te je provedena analiza TAG uz pomoć MALDI-TOF/MS. Dobiveni podaci su obrađeni metodom glavnih komponenta. Analiza položaja uzoraka u koordinatnom prostoru PC1 i PC2 otkriva dvije skupine: čisti uzorci i 1 % krivotvorine s jestivim suncokretovim uljem (slika 35). Isti rezultat je dobiven u analizi čistih uzoraka i 1 % krivotvorina s maslinovim uljem sastavljenim od rafiniranog ulja i djevičanskih maslinovih ulja (slika 36). Uzrok tomu je taj što čista EDMU ulja sadrže visoki udio spojeva koji pozitivno koreliraju s PC1, a 1 % krivotvorine s maslinovim uljem sastavljenim od rafiniranog ulja i djevičanskih maslinovih ulja visok udjel spojeva koji s istom glavnom komponentom negativno koreliraju. Usporedbom pozicije varijabli i uzoraka u obje analize vidljivo je kako su TAG m/z 855.7, 881.8 i 883.8 karakteristični za EDMU (slike 35a i 36a).

Ovim istraživanjem potvrđena je široka primjena MALDI-TOF analize triacilglicerola u kontroli autentičnosti maslinova ulja. Naime, uz određivanje zemljopisnog područja, MALDI-TOF analize triacilglicerola uspješno ukazuju i na krivotvorenje maslinovih ulja.

5.9. Određivanje sadržaja glavnih komponenti ulja i osnovnih parametara kvalitete pomoću NIR spektroskopije

Modeli PLS-DA razvijeni za zemljopisnu klasifikaciju maslinovih ulja uzimaju u obzir samo EDMU. Stoga je prije istraživanja zemljopisnog podrijetla potrebno provjeriti kategoriju maslinovog ulja. Metode koje su propisane pravilnicima za kategorizaciju ulja (Pravilnik o uljima od ploda i komine maslina NN 7/2009, 2009, Uredba Komisije (EEZ) br. 2568/91 od 11. srpnja 1991. o karakteristikama maslinovog ulja i ulja komine maslina te o odgovarajućim metodama analize, 1991) su dugotrajne, iziskuju educiranog analitičara, a provedba analiza vezana je uz visoku potrošnju otapala. Zanimljive i praktične alternative za dosadašnje metode su primjerice nedestruktivne i brze tehnologije poput NIR, FTIR ili Raman spektroskopije (Guzmán i sur., 2011; Jiménez Marquez i sur., 2005). NIR spektar maslinovog ulja pod utjecajem je oksidacijskih promjena u ulju koje utječu na definiranje kvalitete ulja (Cayuela Sánchez i sur., 2013). U ovom istraživanju ispitane su mogućnosti NIR spektroskopije u određivanju osnovnih parametara kvalitete, tj. kategorije hrvatskih maslinovih ulja. Podaci su obrađeni analizom PLS kako bi se

ustanovila korelacija između NIR spektara i osnovnih kemijskih parametara te kako bi se stvorili kalibracijski modeli za predikciju osnovnih kemijskih parametara kod novih uzoraka. U PLS analizi kao slučajevi uzeti su uzorci svih kategorija iz 2015. godine ($n=49$), a kao varijable korištene su vrijednosti osnovnih parametara kvalitete (slobodne masne kiseline, peroksidni broj, K_{232} i K_{270}). Iako većina uzoraka pripada kategoriji EDMU i time je raspon osnovnih parametara kvalitete relativno uzak, ispitani uzorci su indikativni za razinu kvalitete maslinovih ulja proizvedenih u Hrvatskoj i stoga su adekvatni za kalibraciju PLS. Rezultati analize PLS za određivanje osnovnih parametara kvalitete prikazani su u tablici 19. Najbolji model dobio se za određivanje sadržaja slobodnih masnih kiselina s obzirom na visoki koeficijent determinacije 0,98 i vrlo nizak RMESCV koji je iznosio 0,088. Međutim, kvaliteta ostalih kalibracijskih modela bila je nešto niža. PLS kalibracijski modeli u kojoj su peroksidni brojevi ili K_{232} Y varijable, dali su R^2c 0,84, dok je za PLS analize s K_{270} kao Y varijablama R^2c iznosio 0,74. Stvoreni modeli PLS testirani su na novom setu maslinovih ulja koji nisu bili uključeni u izgradnju kalibracije te čine vanjski validacijski set od 11 slučajno odabranih uzoraka maslinovog ulja iz 2015. godine. Usporedba izmjerenih referentnih vrijednosti osnovnih kemijskih parametara i onih predviđenih iz NIR spektra za uzorke iz vanjskog validacijskog seta prikazana je na slici 37. Očekivano je najbolja predikcija bila za sadržaj slobodnih masnih kiselina (R^2p 0,81, RMSEP 0,062). Dobra predikcija je postignuta i za vrijednost K_{232} s obzirom da je R^2p 0,79, a RMSEP 0,127. U oba slučaja RPD je bio viši od 2. Naspram tomu, predikcija peroksidnog broja i K_{270} kod novih uzoraka nije bila toliko uspješna što je vidljivo kroz niže vrijednosti RPD i R^2p . Kalibracijski modeli za predikciju peroksidnog broja i K_{270} iz NIR spektra mogu se poboljšati uvođenjem novih uzoraka s većim vrijednostima peroksidnog broja i K_{270} čime će biti širi i bolje pokriveni rasponi kod kalibracijskih uzoraka. Usprkos tomu, kalibracijski modeli iz ovog istraživanja dovoljni su za početni probir uzoraka koji će ukazivati na to da li uzorak pripada kategoriji ili se nalazi blizu/preko granice za zadanu kategoriju.

Velika prednost NIR tehnologije je što se ovom metodom može istovremeno provesti mjerenje nekoliko komponenti ulja određivanjem apsorpcijskih pojaseva koji su pod utjecajem vibracija molekula. NIR spektar maslinovog ulja odraz je sadržaja glavnih komponenta TAG i MK. Kako bi se ispitala povezanost, tj. mogućnost predikcije udjela pojedinih TAG ili MK iz NIR spektra provedena je statistička obrada podataka. U literaturi se navodi kako su apsorbanције u pojedinim

područjima NIR spektra ili pri određenim valnim duljinama izravno povezane sa sadržajem pojedinih masnih kiselina (Mailer, 2004). Linearnom regresijom doista je pronađena povezanost između sadržaja oleinske kiseline i apsorbancije ulja pri 1667,5 nm ($R^2=0,90$) te linolne kiseline i apsorbancije pri 1819 nm ($R^2=0,96$) što je prikazano na slici 38. Nadalje, PLS analiza je provedena kako bi se razvio kalibracijski model za predikciju sadržaja što većeg broja MK i TAG maslinovog ulja iz istog NIR spektra. Prije same analize testirani su različiti spektralni predtretmani, a najbolji rezultati su dobiveni nakon obrade standardnom normalnom varijacijom (SNV, engl. *standard normal variate*) spektralnog područja od 1333 do 2222 nm. Korelacija je pronađena između NIR spektra i većine TAG kao i između NIR spektra i najzastupljenijih MK (tablica 20). Kod masnih kiselina najbolji regresijski modeli su dobiveni za oleinsku i linolnu kiselinu s R^2 c 0,98, niskim RMSECV (0,520 za oleinsku kiselinu, a 0,434 za linolnu kiselinu) te RECV% manjim od 0,71 i 5,55. Također, sadržaj palmitinske kiseline moguće je precizno odrediti iz NIR spektra (R^2 c 0,97; RMSECV 0,221; RECV% 1,81). Dobri modeli dobiveni su za TAG OOO (R^2 c 0,90; RMSECV 1,442; 3,45) i LOO (R^2 c 0,95; RMSECV 0,733; 7,85). Za ostale više zastupljene TAG i MK iz ulja dobiveni su zadovoljavajući modeli ($R^2>0,69$) iako postoji mogućnost poboljšanja. Za masne kiseline koje se nalaze u neznatnim količinama u maslinovom ulju kao i za tri TAG, predikcijske razine bile su loše. Istraživanje Galtier i sur. (2007) navodi slične poteškoće u predikciji komponenti koje su neznatno zastupljene u maslinovom ulju. Nadalje, isto istraživanje je pokazalo kako se bolja predikcija postiže za TAG zbog njihove očuvane strukture. Na temelju izvršenih analiza može se zaključiti kako je eksperimentalna platforma bazirana na NIR spektroskopiji u kombinaciji s kemometrijom izuzetno dobra za predikciju osnovnih kemijskih parametara, većine TAG te dominantnih MK iz maslinovog ulja.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja maslinovih ulja, dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Tehnologija MALDI-TOF/MS omogućava visokoprotorno određivanje profila triacilglicerola u različitim biljnim uljima uz brzu pripremu uzorka.
2. Za potpunu strukturnu karakterizaciju triacilglicerola potrebno je provesti MS/MS analizu. MALDI-SpiralTOF/TOF analiza omogućava točnu identifikaciju položaja pojedinih masno kiselinskih ostataka na gliceridnoj okosnici na temelju karakterističnih fragmenata, ali u pojedinim slučajevima i poziciju dvostruke veze unutar samog masno kiselinskog ostatka.
3. Analiza GC-MS metilnih estera masnih kiselina omogućava određivanje svih masnih kiselina u maslinovom ulju uključujući i identifikaciju strukturnih/pozicijskih izomera.
4. NIR spektroskopija je brza i nedestruktivna metoda kojom se može odrediti neselektivni „otisak prsta“ maslinovih ulja.
5. Analize masnih kiselina i triacilglicerola su komplementarne metode za potpunu karakterizaciju maslinovih ulja.
6. Maslinova ulja s područja Istre odlikuju se većim sadržajem triacilglicerola s tri oleinska ostatka i sukladno tome većim sadržajem oleinske masne kiseline dok maslinova ulja iz Dalmacije i Kvarnera karakterizira veći sadržaj linolne kiseline.
7. Statistička obrada metodom PCA je pokazala kako analizirane komponente utječu na grupiranje uzorka prema zemljopisnoj pripadnosti. Među njima su triacilgliceroli bili najbolji indikatori zemljopisnog područja za ekstra djevičanska maslinova ulja.
8. Modeli PLS-DA s važnim varijablama iz NIR spektra i triacilglicerolima uspješno mogu provesti klasificiranje ekstra djevičanskih maslinovih ulja s obzirom na zemljopisnu pripadnost.
9. Potvrda zemljopisne pripadnosti istarskih maslinovih ulja moguća je i za ulja različitih godina proizvodnje.

10. Prezentirani predikcijski modeli primjenjivi su samo na ulja s hrvatskog područja, a za ulja koja je nisu iz Hrvatske potrebno je napraviti dodatne analize i nove sveobuhvatnije modele.
11. Kreiranje baze rezultata iz svih provedenih analiza pokazalo se nužno za zemljopisnu diskriminaciju maslinovih ulja. Posebnu su vrijednost pokazale ciljane baze rezultata dobivene PLS-DA analizom koje imaju veliku potenciju za daljnje korištenje u analizi novih setova uzoraka.
12. Krivotvorenje maslinovog ulja s rafiniranim uljima ili maslinovim uljima niže kategorije kvalitete se može uspješno otkriti i iz profila TAG dobivenog analizom MALDI-TOF. Ova metoda je bolja za otkrivanje krivotvorina od spektrofotometrijske analize u ultraljubičastom području zbog osjetljivosti već na 1 % dodatka krivotvorina.
13. NIR tehnologija može se koristiti za određivanje osnovnih parametara kvalitete maslinovog ulja posebno slobodnih masnih kiselina. NIR spektroskopija predstavlja brzu i efikasnu alternativnu metodu za provjeru kategorije kvalitete ulja prije zemljopisne klasifikacije.
14. Sadržaj dominantnih triacilglicerola i masnih kiselina iz maslinovih ulja s velikom sigurnošću se može odrediti iz NIR spektra maslinovog ulja.

7. LITERATURA

- [1] Aghemo, C., Albertino, A., Gobetto, R., Lussiana, C., De Maria, A., Isocrono, D., 2012. Piedmont olive oils: Compositional characterization and discrimination from oils from other regions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 114, 1409–1416.
- [2] Alonso-Salces, R.M., Héberger, K., Holland, M.V., Moreno-Rojas, J.M., Mariani, C., Bellan, G., Reniero, F., Guillou, C., 2010. Multivariate analysis of NMR fingerprint of the unsaponifiable fraction of virgin olive oils for authentication purposes. *Food Chem.* 118, 956–965.
- [3] Alves, J.O., Sena, M.M., Augusti, R., 2014. Multivariate calibration applied to ESI mass spectrometry data: a tool to quantify adulteration in extra virgin olive oil with inexpensive edible oils. *Anal. Methods* 6, 7502–7509.
- [4] Anonymus, 2017. MALDI: JMS-S3000 Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometer | Products | JEOL Ltd. [WWW Document]. URL <https://www.jeol.co.jp/en/products/detail/JMS-S3000.html> (pristupljeno 2.22.18).
- [5] Aparicio, R., Morales, M.T., Aparicio-Ruiz, R., Tena, N., García-González, D.L., 2013. Authenticity of olive oil: Mapping and comparing official methods and promising alternatives. *Food Res. Int.* 54, 2025–2038.
- [6] Araghipour, N., Colineau, J., Koot, A., Akkermans, W., Rojas, J.M.M., Beauchamp, J., Wisthaler, A., Märk, T.D., Downey, G., Guillou, C., Mannina, L., Ruth, S. van, 2008. Geographical origin classification of olive oils by PTR-MS. *Food Chem.* 108, 374–383.
- [7] Aranda, F., Gómez-Alonso, S., Rivera Del Álamo, R.M., Salvador, M.D., Fregapane, G., 2004. Triglyceride, total and 2-position fatty acid composition of Cornicabra virgin olive oil: Comparison with other Spanish cultivars. *Food Chem.* 86, 485–492.
- [8] Asbury, G.R., Al-Saad, K., Siems, W.F., Hannan, R.M., Hill H.H., J., Hill, H.H., 1999. Analysis of triacylglycerols and whole oils by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10, 983–991.
- [9] Ashurst, P.R., Dennis, M.J., 1996. An introduction to food authentication. In: *Food Authentication*. Springer US, Boston, MA, 1–14.

- [10] Badu, M., Awudza, A.M.J., 2017. Determination of the triacylglycerol content for the identification and assessment of purity of shea butter fat, peanut oil, and palm kernel oil using maldi-tof/tof mass spectroscopic technique. *Int. J. Food Prop.* 20, 271–280.
- [11] Baiano, A., Terracone, C., Viggiani, I., Nobile, M.A. Del, 2013. Effects of cultivars and location on quality, phenolic content and antioxidant activity of extra-virgin olive oils. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 90, 103–111.
- [12] Bail, S., Stuebiger, G., Unterweger, H., Buchbauer, G., Krist, S., 2009. Characterization of volatile compounds and triacylglycerol profiles of nut oils using SPME-GC-MS and MALDI-TOF-MS. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 111, 170–182.
- [13] Bajoub, A., Bendini, A., Fernández-Gutiérrez, A., Carrasco-Pancorbo, A., 2018. Olive Oil Authentication: A Comparative Analysis of Regulatory Frameworks with Especial Emphasis on Quality and Authenticity Indices, and Recent Analytical Techniques Developed for Their Assessment. A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 58, 832–857.
- [14] Bajoub, A., Medina-Rodríguez, S., Hurtado-Fernández, E., Ajal, E.A., Ouazzani, N., Fernández-Gutiérrez, A., Carrasco-Pancorbo, A., 2016. A first approach towards the development of geographical origin tracing models for North Moroccan olive oils based on triacylglycerols profiles. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 118, 1223–1235.
- [15] Barbin, D.F., Felicio, A.L. de S.M., Sun, D.W., Nixdorf, S.L., Hirooka, E.Y., 2014. Application of infrared spectral techniques on quality and compositional attributes of coffee: An overview. *Food Res. Int.* 61, 23–32.
- [16] Beauchamp, G.K., Keast, R.S.J., Morel, D., Lin, J., Pika, J., Han, Q., Lee, C.-H., Smith, A.B., Breslin, P.A.S., 2005. Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature* 437, 45–46.
- [17] Beccaria, M., Moret, E., Purcaro, G., Pizzale, L., Cotroneo, A., Dugo, P., Mondello, L., Conte, L.S., 2016. Reliability of the $\Delta\text{eCN}42$ limit and global method for extra virgin olive oil purity assessment using different analytical approaches. *Food Chem.* 190, 216–225.
- [18] Belitz, H.-D., Grosch, W., 1999. Lipids. In: *Food Chemistry*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 152–236.
- [19] Ben-Ayed, R., Kamoun-Grati, N., Rebai, A., 2013. An overview of the authentication of olive tree and oil. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 12, 218–227.

- [20] Bernardini, E., Visioli, F., 2017. High quality, good health: The case for olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 119, 1–9.
- [21] Bevilacqua, M., Bucci, R., Magrì, A.D., Magrì, A.L., Marini, F., 2012. Tracing the origin of extra virgin olive oils by infrared spectroscopy and chemometrics: A case study. *Anal. Chim. Acta.*
- [22] Borges, T.H., Pereira, J.A., Cabrera-Vique, C., Lara, L., Oliveira, A.F., Seiquer, I., 2017. Characterization of Arbequina virgin olive oils produced in different regions of Brazil and Spain: Physicochemical properties, oxidative stability and fatty acid profile. *Food Chem.* 215.
- [23] Boskou, D., 1996. *Olive oil : chemistry and technology*. AOCS Press, Champaign, IL, USA.
- [24] Brereton, R.G., Lloyd, G.R., 2014. Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. *J. Chemom.* 28, 213–225.
- [25] Buckland, G., Gonzalez, C.A., 2015. The role of olive oil in disease prevention: a focus on the recent epidemiological evidence from cohort studies and dietary intervention trials. *Br. J. Nutr.* 113, S94–S101.
- [26] Butinar, B., Bučar-Miklavčič, M., Valenčič, V., Raspor, P., 2010. Stereospecific Analysis of Triacylglycerols as a Useful Means To Evaluate Genuineness of Pumpkin Seed Oils: Lesson from Virgin Olive Oil Analyses. *J. Agric. Food Chem.* 58, 5227–5234.
- [27] Calvano, C.D., Ceglie, C. De, D'Accolti, L., Zambonin, C.G., 2012. MALDI-TOF mass spectrometry detection of extra-virgin olive oil adulteration with hazelnut oil by analysis of phospholipids using an ionic liquid as matrix and extraction solvent. *Food Chem.* 134, 1192–1198.
- [28] Casale, M., Oliveri, P., Casolino, C., Sinelli, N., Zunin, P., Armanino, C., Forina, M., Lanteri, S., 2012. Characterisation of PDO olive oil Chianti Classico by non-selective (UV-visible, NIR and MIR spectroscopy) and selective (fatty acid composition) analytical techniques. *Anal. Chim. Acta* 712, 56–63.
- [29] Cayuela Sánchez, J.A., Moreda, W., García, J.M., 2013. Rapid Determination of Olive Oil Oxidative Stability and Its Major Quality Parameters Using Vis/NIR Transmittance Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 61, 8056–8062.

- [30] Chapagain, B.P., Wiesman, Z., 2009. MALDI-TOF/MS fingerprinting of Triacylglycerols (TAGs) in olive oils produced in the Israeli Negev desert. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1135–1142.
- [31] Cheng, C., Gross, M.L., Pittenauer, E., 1998. Complete Structural Elucidation of Triacylglycerols by Tandem Sector Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 70, 4417–4426.
- [32] Christie, W.W., Han, X., 2010. *Lipid analysis : isolation, separation, identification and lipidomic analysis.* Oily Press, an imprint of PJ Barnes & Associates.
- [33] Christopoulou, E., Lazaraki, M., Komaitis, M., Kaselimis, K., 2004. Effectiveness of determinations of fatty acids and triglycerides for the detection of adulteration of olive oils with vegetable oils. *Food Chem.* 84, 463–474.
- [34] Cicerale, S., Lucas, L., Keast, R., 2010. Biological Activities of Phenolic Compounds Present in Virgin Olive Oil. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 458–479.
- [35] Cindric, M., Markovic, A., Horvatic, A., 2009. Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa : osnove metodologije i primjene. *Medicina (B. Aires).* 45, 218–232.
- [36] Covas, M.-I., Nyyssönen, K., Poulsen, H.E., Kaikkonen, J., Zunft, H.-J.F., Kiesewetter, H., Gaddi, A., de la Torre, R., Mursu, J., Bäumlér, H., Nascetti, S., Salonen, J.T., Fitó, M., Virtanen, J., Marrugat, J., EUROLIVE Study Group, 2006. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* 145, 333–341.
- [37] Cozzolino, D., Morón, A., 2006. Potential of near-infrared reflectance spectroscopy and chemometrics to predict soil organic carbon fractions. *Soil Tillage Res.* 85, 78–85.
- [38] Cozzolino, R., De Giulio, B., 2011. Application of ESI and MALDI-TOF MS for triacylglycerols analysis in edible oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113, 160–167.
- [39] Daccache, A., Lion, C., Sibille, N., Gerard, M., Slomianny, C., Lippens, G., Cotellet, P., 2011. Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors. *Neurochem. Int.* 58, 700–707.
- [40] Dais, P., Hatzakis, E., 2013. Quality assessment and authentication of virgin olive oil by NMR spectroscopy: A critical review. *Anal. Chim. Acta.*
- [41] De La Cruz, J.P., Ruiz-Moreno, M.I., Guerrero, A., Reyes, J.J., Benitez-Guerrero, A., Espartero, J.L., González-Correa, J.A., 2015. Differences in the Neuroprotective Effect of

- Orally Administered Virgin Olive Oil (*Olea europaea*) Polyphenols Tyrosol and Hydroxytyrosol in Rats. J. Agric. Food Chem. 63, 5957–5963.
- [42] Di Girolamo, F., Masotti, A., Lante, I., Scapaticci, M., Calvano, C.D., Zambonin, C., Muraca, M., Putignani, L., 2015. A simple and effective mass spectrometric approach to identify the adulteration of the mediterranean diet component extra-virgin olive oil with corn oil. Int. J. Mol. Sci. 16, 20896–20912.
- [43] Dron, J., Linke, R., Rosenberg, E., Schreiner, M., 2004. Trimethylsulfonium hydroxide as derivatization reagent for the chemical investigation of drying oils in works of art by gas chromatography. J. Chromatogr. A 1047, 111–116.
- [44] Državni zavod za intelektualno vlasništvo Republike Hrvatske, 2011. Oznake zemljopisnog podrijetla i oznake izvornosti [WWW Document]. URL <http://www.dziv.hr/hr/intelektualno-vlasnistvo/oznake/> (pristupljeno 11.2.17).
- [45] Dupuy, N., Galtier, O., Ollivier, D., Vanloot, P., Artaud, J., 2010. Comparison between NIR, MIR, concatenated NIR and MIR analysis and hierarchical PLS model. Application to virgin olive oil analysis. Anal. Chim. Acta 666, 23–31.
- [46] EC, 2012. European Commission : CORDIS : Projects and Results : Tracing Food Commodities in Europe [WWW Document]. URL https://cordis.europa.eu/project/rcn/78480_en.html (pristupljeno 3.15.18).
- [47] Emerson, B., Gidden, J., Lay, J.O., Durham, B., 2010. A rapid separation technique for overcoming suppression of triacylglycerols by phosphatidylcholine using MALDI-TOF MS. J. Lipid Res. 51, 2428–2434.
- [48] Esslinger, S., Riedl, J., Fauhl-Hassek, C., 2014. Potential and limitations of non-targeted fingerprinting for authentication of food in official control. Food Res. Int. 60, 189–204.
- [49] European Commission, 1991. Characteristics of olive oil and olive-residue oil and relevant methods of analysis. Commission regulation EEC/2568/91 as amended. Off. J. Eur. Communities L248, 1–83.
- [50] European Commission, 2012. COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) No 29/2012 of 13 January 2012 on marketing standards for olive oil. Off. J. Eur. Union.
- [51] European Commission, 2013. COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) No

- 1348/2013 of 16 December 2013 amending Regulation (EEC) No 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis.
- [52] European Commission, 2018. DOOR [WWW Document]. URL <http://ec.europa.eu/agriculture/quality/door/list.html?&recordStart=0&filter.country=HR> (pristupljeno 11.2.17).
- [53] Europska Komisija, 2012. UREDBA KOMISIJE (EU) br. 432/2012 od 16. svibnja 2012. o utvrđivanju popisa dopuštenih zdravstvenih tvrdnji koje se navode na hrani, osim onih koje se odnose na smanjenje rizika od bolesti te na razvoj i zdravlje djece. Službeni List Eur. Unije.
- [54] Fahy, E., Sud, M., Cotter, D., Subramaniam, S., 2007. LIPID MAPS online tools for lipid research. *Nucleic Acids Res.* 35, 606–612.
- [55] Farr, S.A., Price, T.O., Dominguez, L.J., Motisi, A., Saiano, F., Niehoff, M.L., Morley, J.E., Banks, W.A., Ercal, N., Barbagallo, M., 2012. Extra virgin olive oil improves learning and memory in SAMP8 mice. *J. Alzheimers. Dis.* 28, 81–92.
- [56] Fasciotti, M., Pereira Netto, A.D., 2010. Optimization and application of methods of triacylglycerol evaluation for characterization of olive oil adulteration by soybean oil with HPLC–APCI–MS–MS. *Talanta* 81, 1116–1125.
- [57] Fuchs, B., Süß, R., Schiller, J., 2010. An update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research. *Prog. Lipid Res.* 49, 450–475.
- [58] Fuchs, B., Süß, R., Teuber, K., Eibisch, M., Schiller, J., 2011. Lipid analysis by thin-layer chromatography—A review of the current state. *J. Chromatogr. A* 1218, 2754–2774.
- [59] Gaforio, J.J., Sánchez-Quesada, C., López-Biedma, A., Ramírez-Tortose, M. del C., Warleta, F., 2015. Molecular Aspects of Squalene and Implications for Olive Oil and the Mediterranean Diet. In: *The Mediterranean Diet*. Elsevier, pp. 281–290.
- [60] Gallina Toschi, T., Bendini, A., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., Conte, L., 2013. Misdescription of edible oils: Flowcharts of analytical choices in a forensic view. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 115, 1205–1223.
- [61] Galtier, O., Dupuy, N., Le Dréau, Y., Ollivier, D., Pinatel, C., Kister, J., Artaud, J., 2007. Geographic origins and compositions of virgin olive oils determined by chemometric

- analysis of NIR spectra. *Anal. Chim. Acta* 595, 136–144.
- [62] Giordano, E., Davalos, A., Nicod, N., Visioli, F., 2014. Hydroxytyrosol attenuates tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress in human hepatocarcinoma cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 954–962.
- [63] Gómez-Alonso, S., Salvador, M.D., Fregapane, G., 2004. Evolution of the oxidation process in olive oil triacylglycerol under accelerated storage conditions (40–60°C). *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81, 177–184.
- [64] Gugić, M., Šarolić, M., 2017. *Maslina i proizvodi*. Ogranak Matice hrvatske, Sinj.
- [65] Guzmán, E., Baeten, V., Fernández Pierna, J.A., García-Mesa, J.A., 2011. Application of low-resolution Raman spectroscopy for the analysis of oxidized olive oil. *Food Control* 22, 2036–2040.
- [66] Hillenkamp, F., Peter-Katalinic, J., 2013. *MALDI MS : a practical guide to instrumentation, methods, and applications*. Wiley.
- [67] Hourant, P., Baeten, V., Meurens, M., Morales, M.T., Aparicio, R., 2000. Oil and Fat Classification by Selected Bands of Near-Infrared Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* Vol. 54, Issue 8, pp. 1168–1174 54, 1168–1174.
- [68] Indelicato, S., Bongiorno, D., Pitonzo, R., Di Stefano, V., Calabrese, V., Indelicato, S., Avellone, G., 2017. Triacylglycerols in edible oils: Determination, characterization, quantitation, chemometric approach and evaluation of adulterations. *J. Chromatogr. A* 1515, 1–16.
- [69] IOC, 2015. *Determination of Fatty Acid Methyl Esters By Gas Chromatography*.
- [70] Issaoui, M., Flamini, G., Brahmi, F., Dabbou, S., Hassine, K. Ben, Taamali, A., Chehab, H., Ellouz, M., Zarrouk, M., Hammami, M., 2010. Effect of the growing area conditions on differentiation between Chemlali and Chétoui olive oils. *Food Chem.* 119, 220–225.
- [71] Istarsko ulje dijeli oznaku “Istra” sa Slovincima [WWW Document], n.d. URL <https://www.agroklub.com/prehrambena-industrija/istarsko-ulje-dijeli-oznaku-istra-sa-slovincima/31738/> (pristupljeno 11.3.17).
- [72] Jakab, A., Nagy, K., Héberger, K., Vékey, K., Forgács, E., 2002. Differentiation of vegetable oils by mass spectrometry combined with statistical analysis. *Rapid Commun. Mass*

Spectrom. 16, 2291–2297.

- [73] Jednačak, T., Novak, P., 2013. Procesne analitičke tehnike temeljene na vibracijskoj spektroskopiji in-line i primjena u industriji 62, 71–80.
- [74] Jergović, A.-M., Peršurić, Ž., Saftić, L., Kraljević Pavelić, S., 2017. Evaluation of MALDI-TOF/MS Technology in Olive Oil Adulteration. J. Am. Oil Chem. Soc. 1–9.
- [75] Jiménez Marquez, A., Molina Díaz, A., Pascual Reguera, M.I., 2005. Using optical NIR sensor for on-line virgin olive oils characterization. Sensors Actuators B Chem. 107, 64–68.
- [76] Jolliffe, I.T., 2002. Principal Component Analysis, Second Edition. New York: John Wiley and Sons.
- [77] Jukić Špika, M., Žanetic, M., Pinatel, C., Vitanovic, E., Strikic, F., 2013. Fatty acid and triacylglycerol profile of Levantinka virgin olive oil. In: Jukić, A. (Ed.), 14th Ružička Days TODAY SCIENCE - TOMORROW INDUSTRY. Croatian Society of Chemical Engineers Faculty of Food Technology Osijek, Zagreb i Osijek, 213–219.
- [78] Kamal-Eldin, A., Kamal-Eldin, Afaf, 2005. Minor Components of Fats and Oils. In: Bailey's Industrial Oil and Fat Products. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- [79] Kammoun, N.G., Zarrouk, W., 2012. Exploratory chemometric analysis for the characterisation of Tunisian olive cultivars according to their lipid and sterolic profiles. Int. J. Food Sci. Technol. 47, 1496–1504.
- [80] Kantoci, D., 2006. Maslina. Glas. Zaštite Bilja 29, 4–14.
- [81] Kiritsakis, A.K., 1990. Olive oil. American Oil Chemists' Society.
- [82] Koprivnjak, O., 2006. Djevičansko maslinovo ulje : od masline do stola. MIH.
- [83] Koprivnjak, O., Červar, A., 2010. PROIZVODNE KARAKTERISTIKE MASLINARSKO-ULJARSKE DJELATNOSTI U ISTARSKOJ ŽUPANIJI. Agron. Glas. 2–3, 125–142.
- [84] Koprivnjak, O., Vrhovnik, I., Hladnik, T., Prgomet, Ž., Hlevnjak, B., Majetić, V., 2012. Obilježja prehrambene vrijednosti djevičanskih maslinovih ulja sorti Buža , Istarska bjelica , Leccino i Rosulja Characteristics of Nutritive Value of Virgin Olive Oils from uža , Istarska bjelica , Leccino and Rosulja Cultivars. Croat. J. Food Technol. Biotechnol. Nutr. 7, 172–178.

- [85] Krist, S., Stuebiger, G., Bail, S., Unterweger, H., 2006. Detection of adulteration of poppy seed oil with sunflower oil based on volatiles and triacylglycerol composition. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6385–6389.
- [86] Kubo, A., Satoh, T., Itoh, Y., Hashimoto, M., Tamura, J., Cody, R.B., 2013. Structural analysis of triacylglycerols by using a MALDI-TOF/TOF system with monoisotopic precursor selection. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 24, 684–689.
- [87] Laroussi-Mezghani, S., Vanloot, P., Molinet, J., Dupuy, N., Hammami, M., Grati-Kamoun, N., Artaud, J., 2015. Authentication of Tunisian virgin olive oils by chemometric analysis of fatty acid compositions and NIR spectra. Comparison with Maghrebian and French virgin olive oils. *Food Chem.* 173, 122–132.
- [88] Lay, J.O., Liyanage, R., Durham, B., Brooks, J., 2006. Rapid characterization of edible oils by direct matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis using triacylglycerols. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 952–958.
- [89] Lee, D.-S., Lee, E.-S., Kim, H.-J., Kim, S.-O., Kim, K., 2001. Reversed phase liquid chromatographic determination of triacylglycerol composition in sesame oils and the chemometric detection of adulteration. *Anal. Chim. Acta* 429, 321–330.
- [90] Longobardi, F., Ventrella, A., Casiello, G., Sacco, D., Catucci, L., Agostiano, A., Kontominas, M.G., 2012a. Instrumental and multivariate statistical analyses for the characterisation of the geographical origin of Apulian virgin olive oils. *Food Chem.* 133, 579–584.
- [91] Longobardi, F., Ventrella, a., Casiello, G., Sacco, D., Tasioula-Margari, M., Kiritsakis, a. K., Kontominas, M.G., 2012b. Characterisation of the geographical origin of Western Greek virgin olive oils based on instrumental and multivariate statistical analysis. *Food Chem.* 133, 169–175.
- [92] Mailer, R.J., 2004. Rapid evaluation of olive oil quality by NIR reflectance spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81, 823–827.
- [93] Marrugat, J., Covas, M.-I., Fitó, M., Schröder, H., Miró-Casas, E., Gimeno, E., López-Sabater, M.C., de la Torre, R., Farré, M., SOLOS Investigators, 2004. Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation. *Eur. J. Nutr.* 43, 140–147.
- [94] Martín-Peláez, S., Covas, M.I., Fitó, M., Kušar, A., Pravst, I., 2013. Health effects of olive

- oil polyphenols: Recent advances and possibilities for the use of health claims. *Mol. Nutr. Food Res.* 57, 760–771.
- [95] Martínez-González, M.A., Salas-Salvadó, J., Estruch, R., Corella, D., Fitó, M., Ros, E., PREDIMED INVESTIGATORS, 2015. Benefits of the Mediterranean Diet: Insights From the PREDIMED Study. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 58, 50–60.
- [96] Martinović, S., Jukić, A., Doležal, D., Špehar, B., Krištović, M., 2012. PREDVIĐANJE SVOJSTAVA RABLJENIH MAZIVIH ULJA PRIMJENOM INFRAFRACRVENE SPEKTROSKOPIJE I MULTIVARIJANTNE ANALIZE. *Goriva i Maz. časopis za Tribol. Teh. Pod. i Primjen. tekućih i plinovitih goriva i inženjerstvo izgaranja* 51, 194–204.
- [97] Medina-Remón, A., Tresserra-Rimbau, A., Pons, A., Tur, J.A., Martorell, M., Ros, E., Buil-Cosiales, P., Sacanella, E., Covas, M.I., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Gómez-Gracia, E., Ruiz-Gutiérrez, V., Ortega-Calvo, M., García-Valdúenza, M., Arós, F., Saez, G.T., Serra-Majem, L., Pinto, X., Vinyoles, E., Estruch, R., Lamuela-Raventós, R.M., PREDIMED Study Investigators, 2015. Effects of total dietary polyphenols on plasma nitric oxide and blood pressure in a high cardiovascular risk cohort. The PREDIMED randomized trial. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 25, 60–67.
- [98] Menéndez, J.A., Vellon, L., Colomer, R., Lupu, R., 2005. Oleic acid, the main monounsaturated fatty acid of olive oil, suppresses Her-2/neu (erbB-2) expression and synergistically enhances the growth inhibitory effects of trastuzumab (Herceptin™) in breast cancer cells with Her-2/neu oncogene amplification. *Ann. Oncol.* 16, 359–371.
- [99] Mesić, Ž., Lončar, H., Dolić, Z., Tomić, M., 2015. Analiza svjetskog i hrvatskog tržišta maslinovog ulja. *Agron. Glas.* 4–6, 227–240.
- [100] Miller, R.G.J., 1986. Beyond ANOVA, basics of applied statistics, Beyond ANOVA, basics of applied statistics.
- [101] Newmark, H.L., 1999. Squalene, Olive Oil, and Cancer Risk: Review and Hypothesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 889, 193–203.
- [102] Ng, T.-T., Li, S., Ng, C.C.A., So, P.-K., Wong, T.-F., Li, Z.-Y., Chan, S.-T., Yao, Z.-P., 2018. Establishment of a spectral database for classification of edible oils using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Food Chem.* 252, 335–342.

- [103] Nunes, C. a., 2014. Vibrational spectroscopy and chemometrics to assess authenticity, adulteration and intrinsic quality parameters of edible oils and fats. *Food Res. Int.* 60, 255–261.
- [104] OLEUM consortium, 2017. List of existing databases on olives and olive oils. The OLEUM project.
- [105] Oliveri, P., Casale, M., Casolino, M.C., Baldo, M.A., Nizzi Grifi, F., Forina, M., 2011. Comparison between classical and innovative class-modelling techniques for the characterisation of a PDO olive oil. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 2105–2113.
- [106] Olivieri, A.C., Goicoechea, H.C., Iñón, F.A., 2004. MVC1: An integrated MatLab toolbox for first-order multivariate calibration. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 73, 189–197.
- [107] Ollivier, D., Artaud, J., Pinatel, C., Durbec, J.P., Guérère, M., 2003. Triacylglycerol and fatty acid compositions of French virgin olive oils. Characterization by chemometrics. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5723–5731.
- [108] Paiva-Martins, F., Fernandes, J., Rocha, S., Nascimento, H., Vitorino, R., Amado, F., Borges, F., Belo, L., Santos-Silva, A., 2009. Effects of olive oil polyphenols on erythrocyte oxidative damage. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 609–616.
- [109] Perri, E., Benincasa, C., Muzzalupo, I., 2012. Olive Oil Traceability. In: Muzzalupo, I. (Ed.), *Olive Germplasm - The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy*. InTech.
- [110] Peršurić, Ž., Osuga, J., Galinac Grbac, T., Peter-Katalinić, J., Kraljević Pavelić, S., 2017. MALDI-SpiralTOF technology for assessment of triacylglycerols in Croatian olive oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 119, 1500375.
- [111] Picariello, G., Romano, R., Addeo, F., 2010. Nitrocellulose Film Substrate Minimizes Fragmentation in Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Analysis of Triacylglycerols. *Anal. Chem.* 82, 5783–5791.
- [112] Piscopo, A., De Bruno, A., Zappia, A., Ventre, C., Poiana, M., 2016. Characterization of monovarietal olive oils obtained from mills of Calabria region (Southern Italy). *Food Chem.* 213, 313–318.
- [113] Pittenauer, E., Allmaier, G., 2009. The Renaissance of High-Energy CID for Structural Elucidation of Complex Lipids: MALDI-TOF/RTOF-MS of Alkali Cationized Triacylglycerols.

- J. Am. Soc. Mass Spectrom. 20, 1037–1047.
- [114] Poljuha, D., 2017. CROLIVE [WWW Document]. URL <http://cpgrd.hcphs.hr/gb/fruit/olives/about> (pristupljeno 4.13.18).
- [115] Poljuha, D., Sladonja, B., Bubola, K.B., Radulovic, M., Kristina, B., Setic, E., Krapac, M., Milotic, A., 2008. A Multidisciplinary Approach to the Characterisation of Autochthonous Istrian Olive (*Olea europaea* L.) Varieties. *Food Technol. Biotechnol.* 46, 347–354.
- [116] Pravilnik o uljima od ploda i komine maslina NN 7/2009, 2009. . NN.
- [117] Rabasco Alvarez, A.M., González Rodríguez, M.L., Rodríguez, M.L.G., 2000. Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations. *Grasas y Aceites* 51, 74–96.
- [118] Rohman, A., Che Man, Y.B., Yusof, F.M., 2014. The use of FTIR spectroscopy and chemometrics for rapid authentication of extra virgin olive oil. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 91, 207–213.
- [119] Rubert, J., Zachariasova, M., Hajslova, J., 2015. Advances in high-resolution mass spectrometry based on metabolomics studies for food – a review. *Food Addit. Contam. Part A* 32, 1685–1708.
- [120] Sakouhi, F., Absalon, C., Kallel, H., Boukhchina, S., 2010. Comparative analysis of triacylglycerols from *Olea europaea* L. fruits using HPLC and MALDI-TOFMS. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112, 574–579.
- [121] Sales-Campos, H., Reis de Souza, P., Crema Peghini, B., Santana da Silva, J., Ribeiro Cardoso, C., 2013. An Overview of the Modulatory Effects of Oleic Acid in Health and Disease. *Mini-Reviews Med. Chem.* 13, 201–210.
- [122] Salguero-Chaparro, L., Peña-Rodríguez, F., 2014. On-line versus off-line NIRS analysis of intact olives. *LWT - Food Sci. Technol.* 56, 363–369.
- [123] Sánchez-Rodríguez, M.I., Sánchez-López, E.M., Marinas, A., Caridad, J.M., Urbano, F.J., Marinas, J.M., 2014. New approaches in the chemometric analysis of infrared spectra of extra-virgin olive oils. *SORT* 38, 231–250.
- [124] Saraiva, S.A., Cabral, E.C., Eberlin, M.N., Catharino, R.R., 2009. Amazonian vegetable oils and fats: Fast typification and quality control via triacylglycerol (TAG) profiles from dry matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass

- spectrometry fingerprinting. *J. Agric. Food Chem.* 57, 4030–4034.
- [125] Schiller, J., Fuchs, B., 2013. Lipids. In: Hillenkamp, F., Peter-Katalinić, J. (Eds.), *MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods, and Applications*, Second Edition. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 273–311.
- [126] Schwingshackl, L., Hoffmann, G., 2014. Monounsaturated fatty acids, olive oil and health status: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Lipids Health Dis.* 13, 154.
- [127] Semmar, N., Laroussi-Mezghani, S., Grati-Kamoun, N., Hammami, M., Artaud, J., 2016. A new simplex chemometric approach to identify olive oil blends with potentially high traceability. *Food Chem.* 208, 150–160.
- [128] Serbetar, I., 2012. Partial Least Squares Regression Analysis: Example of Motor Fitness Data. *Croat. J. Educ. Hrvat. časopis za Odgoj i Obraz.* 14, 917–932.
- [129] Shimma, S., Kubo, A., Satoh, T., Toyoda, M., 2012. Detailed structural analysis of lipids directly on tissue specimens using a MALDI-spiralTOF-reflectron tof mass spectrometer. *PLoS One* 7, 3–10.
- [130] Škarica, B., Žužić, I., Bonifačić, M., 1996. Maslina i maslinovo ulje visoke kakvoce u Hrvatskoj. M. Bonifačić.
- [131] Škevin, D., Kraljić, K., Miletić, L., Obranović, M., Neđeral, S., Petričević, S., 2011. Adulteration of Oblica Virgin Olive Oil with Edible Sunflower and Refined Olive Pomace Oil. *Croat. J. Food Technol. Biotechnol. Nutr.* 6, 117–122.
- [132] Škevin, D., Rade, D., Štrucelj, D., Mokrovčak, Ž., Nederal, S., Benčić, D., 2003. The influence of variety and harvest time on the bitterness and phenolic compounds of olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105, 536–541.
- [133] Sladonja, B., Radulović, M., Brkić, K., 2006. Oznaka izvornosti i zemljopisnog podrijetla maslina i maslinovog ulja u Hrvatskoj. *Pomol. Croat.* 12, 175–188.
- [134] Smaniotto, A., Montanari, L., Flego, C., Rizzi, A., Ragazzi, E., Seraglia, R., Traldi, P., 2008. Can crude oils be distinguished by different component distribution obtained by laser desorption ionization mass spectrometry and evaluated by chemometrics? *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, 1597–1606.
- [135] Stefanoudaki, E., Kotsifaki, F., Koutsaftakis, A., 1999. Classification of virgin olive oils of

- the two major Cretan cultivars based on their fatty acid composition. *JAACS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 76, 623–626.
- [136] Terzuoli, E., Giachetti, A., Ziche, M., Donnini, S., 2016. Hydroxytyrosol, a product from olive oil, reduces colon cancer growth by enhancing epidermal growth factor receptor degradation. *Mol. Nutr. Food Res.* 60, 519–529.
- [137] Tutino, V., Orlando, A., Russo, F., Notarnicola, M., 2016. Hydroxytyrosol Inhibits Cannabinoid CB1 Receptor Gene Expression in 3T3-L1 Preadipocyte Cell Line. *J. Cell. Physiol.* 231, 483–489.
- [138] Uredba Komisije (EEZ) br. 2568/91 od 11. srpnja 1991. o karakteristikama maslinovog ulja i ulja komine maslina te o odgovarajućim metodama analize, 1991.
- [139] Vissers, M.N., Zock, P.L., Katan, M.B., 2004. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. *Eur. J. Clin. Nutr.* 58, 955–965.
- [140] Westad, F., Schmidt, A., Kermit, M., 2008. Incorporating chemical band-assignment in near infrared spectroscopy regression models. In: *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 265–273.
- [141] Wold, S., Sjöström, M., Eriksson, L., 2001. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 58, 109–130.
- [142] Woodcock, T., Downey, G., O'Donnell, C.P., 2008. Confirmation of Declared Provenance of European Extra Virgin Olive Oil Samples by NIR Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 56, 11520–11525.
- [143] Xie, J., Liu, T., Yu, Y., Song, G., Hu, Y., 2013. Rapid detection and quantification by GC-MS of camellia seed oil adulterated with soybean oil. *JAACS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 90, 641–646.
- [144] Yang, Y., Ferro, M.D., Cavaco, I., Liang, Y., 2013. Detection and Identification of Extra Virgin Olive Oil Adulteration by GC-MS Combined with Chemometrics 61, 3693–3702.
- [145] Yorulmaz, A., Erinc, H., Tekin, A., 2013. Changes in olive and olive oil characteristics during maturation. *JAACS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 90, 647–658.
- [146] Zanetic, M., Cerretani, L., Del Carlo, M., 2007. Preliminary Characterisation of Monovarietal Extra-Virgin Olive Oils Obtained From Different Cultivars in Croatia. *J.*

Commod. Sci. Technol. Qual. 46, 79–94.

- [147] Žanetić, M., Gugić, M., 2006. Zdravstvene vrijednosti maslinovog ulja. Pomol. Croat. 12, 159–173.

8. POPIS KRATICA

ANOVA	Analiza varijanci
APCI	Kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku
CID	Kolizijski izazvana disocijacija
DMU	Djevičansko maslinovo ulje
EDMU	Ekstra djevičansko maslinovo ulje
EI	Ionizacija elektronima
ESI	Ionizacijom elektroraspršenjem
FID	Plameno ionizacijski detektor
GC	Plinska kromatografija
HDL	Lipoproteini visoke gustoće
HPLC	Tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti
LC	Tekućinska kromatografija
LDA	Linearna diskriminantna analiza
LDL	Lipoproteini niske gustoće
MALDI	Matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom
MIR	Srednja infracrvena
MK	Masne kiseline
MS	Masena spektrometrija
MS/MS	Tandemna spektrometrija masa
MUL	Maslinovo ulje lampante

NIR	Bliska infracrvena
NMR	Nuklearna magnetska rezonancija
PCA	Metoda glavnih komponenta
PLS-DA	Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata - diskriminanta analiza
RID	Detektor indeksa refrakcije
TAG	Triacilglicerol/i
TIC	Ukupni ionski kromatogram
TLC	Tankoslojna kromatografija
TMSH	Trimetilsulfonijev hidroksid
TOF	Analizator vremena proleta

9. POPIS ILUSTRACIJA

SLIKE

Slika 1. Fischerova projekcija glicerola i triacilglicerola s naznačenim pozicijama masnih kiselina.

Slika 2. Produkt ioni nastali fragmentacijom natrijevih adukta triacilglicerola ($M+Na^+$) koji omogućavaju određivanje masnih kiselina koje su prisutne u TAG, ali ne i njihovu pozicijsku raspodjelu: A- tip iona nastaje „charge-remote“ fragmentacijom masno kiselinskih ostataka, B- i C- tip iona ukazuju koje su masne kiseline u TAG, a D- tip iona je rezultat gubitka ugljikovodičnih lanaca dvaju masno kiselinskih ostataka.

Slika 3. Produkt ioni koji nastaju fragmentacijom natrijevog adukta triacilglicerola ($M+Na^+$), a omogućavaju određivanje pozicijske raspodjele pojedinih masno kiselinskih ostataka unutar gliceridne okosnice: E-, F- i G- tip iona nastaju od masno kiselinskih ostataka na *sn-1* i *sn-3* poziciji, dok je J- tip iona karakterističan za poziciju *sn-2*.

Slika 4. MALDI-TOF Ultraflexxtreme (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany).

Slika 5. MALDI-TOF/MS JMS-S3000 SpiralTOF (JEOL Ltd, Japan).

Slika 6. Usporedba profila TAG u MALDI-TOF spektru dobivenog za a) uzorak maslinovog ulja, b) suncokretovog ulja i c) sezamovog ulja.

Slika 7. Uvećani prikaz mješavine uzorka i matrice nanosene na MALDI pločicu „spot“.

Slika 8. Usporedba MALDI-TOF spektara u području triacilglicerola dobivenog za a) maslinovog uzorka s Kvarnera i b) maslinovo ulje iz Istre.

Slika 9. Produkt ioni nastali fragmentacijom iona 901.7 kod uzoraka a) maslinovog ulja s Kvarnera sorte *Oblica*, b) suncokretovog ulja i c) sezamovog ulja. Analizom A-, B-, C-, G- i J- tipa iona može se zaključiti da je kod svih uzoraka m/z 901.7 triacilglicerol s tri linoleoil ostataka.

Slika 10. Spektri produkt iona nastalih fragmentacijom prekursorskog iona 901.7 m/z u analizi : a) maslinovog ulja s Kvarnera, sorte *Oblica*, b) suncokretovog ulja c) sezamovog ulja. Područje

spektra od 650 do 890 m/z indikativno je za određivanje pozicije dvostruke veze unutar masno kiselinskih ostataka zahvaljujući tzv. „charge-remote“ fragmentaciji.

Slika 11. Produkt ioni nastali fragmentacijom iona m/z 877.7 u uzorku maslinovog ulja sorte *Simjaca* s Kvarnerskog područja. Prema karakterističnim ionima može se zaključiti da ion m/z 877.7 čine dva triacilglicerola PLL i POLn.

Slika 12. Produkt ioni nastali kao fragmentacijom iona m/z 877.7 u uzorcima a) suncokretovog ulja i b) sezamovog ulja. Točna strukturna identifikacija prema karakterističnim ionima pokazala je da kod suncokretovog ulja ion m/z 877.7 čine pozicijski izomeri PLL i LPL, dok je kod sezamovog ulja prisutan samo PLL.

Slika 13. Spektri s produkt ionima nastalim fragmentacijom iona m/z 907.8 u uzorcima istarskih maslinovih ulja a) sorte *Buža* i b) sorte *Istarska bjelica*. Kod oba uzorka maslinovog ulja ion m/z 907.8 je TAG OOO.

Slika 14. Ukupni ionski kromatogram dobiven analizom metil estera masnih kiselina u maslinovom ulju iz Istre.

Slika 15. Maseni spektar oleinske kiseline.

Slika 16. Snimljeni spektar maslinovog ulja iz Istre u području od 400 do 2500 nm dobiven NIR spektroskopijom.

Slika 17. NIR spektri maslinovih ulja iz Hrvatske u području od 1000 do 2222 nm.

Slika 18. PCA s uzorcima maslinovog ulja iz 2014. godine u kojoj su varijable sastav i udio masnih kiselina: a) projekcija varijabli u prostoru glavnih komponenti (PC1 i PC2), b) projekcija uzoraka i njihovo grupiranje u prostoru glavnih komponentata (PC1 i PC2).

Slika 19. PCA s uzorcima maslinovog ulja iz 2014. godine u kojoj su varijable sastav i udio triacilglicerola: a) projekcija varijabli u prostoru glavnih komponenti (PC1 i PC2), b) projekcija uzoraka i njihovo grupiranje u prostoru glavnih komponentata (PC1 i PC2).

Slika 20. PCA s uzorcima maslinovog ulja iz 2014. godine u kojoj su varijable NIR spektar maslinovog ulja od 1000 do 2222 nm : a) projekcija varijabli u prostoru glavnih komponenti (PC1 i PC2), b) projekcija uzoraka i njihovo grupiranje u prostoru glavnih komponenta (PC1 i PC2).

Slika 21. PCA s uzorcima maslinovog ulja iz 2015. godine u kojoj su varijable sastav i udio masnih kiselina: a) projekcija varijabli u prostoru glavnih komponenti (PC1 i PC2), b) projekcija uzoraka i grupiranje u prostoru glavnih komponenta (PC1 i PC2).

Slika 22. PCA s uzorcima maslinovog ulja iz 2015. godine u kojoj su varijable sastav i udio triacilglicerola: a) projekcija varijabli u prostoru glavnih komponenti (PC1 i PC2), b) projekcija uzoraka i grupiranje u prostoru glavnih komponenta (PC1 i PC2).

Slika 23. PCA s uzorcima maslinovog ulja iz 2015. godine u kojoj su varijable NIR spektar od 1000 do 2222 nm : a) projekcija varijabli u prostoru glavnih komponenti (PC1 i PC2), b) projekcija uzoraka i grupiranje u prostoru glavnih komponenta (PC1 i PC2).

Slika 24. Graf ovisnosti varijance Y o broju faktora kod određivanja zemljopisnog područja odabranim varijablama iz NIR područja. Zelena linija predstavlja kalibraciju, dok siva linija predstavlja križnu validaciju. Najveća vrijednost krivulje prije postizanja platoa ukazuje na optimalni broj faktora za dotični model. U ovom modelu odabrana su 3 faktora jer opisuju najveću varijacije u križnoj validaciji.

Slika 25. X varijable i njihovi regresijski koeficijent kod PLS-DA modela s NIR varijablama. Zaokružene su važne varijable čiji je regresijski koeficijent statistički značajan.

Slika 26. X varijable i njihovi regresijski koeficijent kod modela PLS-DA s masnim kiselinama i triacilglicerolima. Kao važne varijable identificirani su PLP, PLL, POL, POO, LLO/LOL, LOO, OOO, C18:1n9 i C18:2n6.

Slika 27. Projekcija uzoraka iz 2014. i 2015. godine (n=84) u prostoru glavnih komponenta (PC1 i PC2). Kao varijable u analizi korišten je sastav i udio triacilglicerola.

Slika 28. Projekcija uzoraka ekstra djevičanskih maslinovih ulja koji nisu iz Hrvatske u prostoru glavnih komponenti (PC1 i PC2) dobivenih kalibracijskom PCA analizom s uzorcima iz Hrvatske

(2015. godina) u kojoj su varijable sastav TAG. Zelenim zaokruženim kružićem su označeni uzorci koji nisu hrvatski, a plavim kružićima kalibracijski hrvatski uzorci maslinovog ulja.

Slika 29. Mogućnost detekcije krivotvorenja ekstra djevičanskog maslinovog ulja Id23 sa S i R na temelju zadanih graničnih vrijednosti za a) K_{232} , b) K_{270} , c) ΔK . Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina tri određivanja. Crtom su označene granične vrijednosti propisane pravilnikom za kategoriju EDMU ($K_{232} \leq 2,50$; $K_{270} \leq 0,22$; $\Delta K \leq 0,01$).

Slika 30. Usporedba MALDI-TOF spektra u području od 850 do 920 m/z između uzoraka a) ekstra djevičanskog maslinovog ulja (Id23), b) jestivog suncokretovog ulja (S) i c) maslinovog ulja sastavljenog od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja (R).

Slika 31. Usporedba između sadržaja najznačajnijih TAG (m/z 881.8, 901.7, 903.7, 905.8 i 907.8) za ekstra djevičansko maslinovo ulje (Id23) i maslinovog ulja sastavljenog od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja (R) te njihovih mješavina (R1, R10 i R20). Dodavanjem R u Id23 postupno se mijenja udio prikazanih TAG na način da se manje zastupljenim TAG povećava udio, dok se udio TAG karakterističnih za ekstra djevičansko maslinovo ulje smanjuje.

Slika 32. Usporedba između sadržaja najznačajnijih TAG (m/z 881.8, 901.7, 903.7, 905.8 i 907.8) za ekstra djevičansko maslinovo ulje (Id23) i suncokretovog ulja (S) te njihovih mješavina (S1, S10 i S20). Dodavanjem S u Id23 postupno se mijenja udio prikazanih TAG na način da se manje zastupljenim TAG povećava udio, dok se udio TAG karakterističnih za ekstra djevičansko maslinovo ulje smanjuje.

Slika 33. Projekcija varijabli u prostoru glavnih komponenti (PC1 i PC2).

Slika 34. Projekcija uzoraka Id23, R i S te mješavina u prostoru glavnih komponenti (PC1 i PC2) na temelju TAG varijabli.

Slika 35. Projekcija a) varijabli i b) uzoraka u prostoru glavnih komponenti (PC1 i PC2). U provedenoj analizi uzorci su ekstra djevičanska maslinova ulja i njihove mješavine nastale dodavanjem 1 % jestivog suncokretovog ulja. U PCA grafu ekstra djevičanska ulja su označena sa plavim kvadratićem, a mješavine s 1 % S su označene s crvenim trokutićem.

Slika 36. Projekcija a) varijabli i b) uzoraka u prostoru glavnih komponenti (PC1 i PC2). U provedenoj analizi uzorci su ekstra djevičanska maslinova ulja i njihove mješavine nastale dodavanjem 1 % R. U PCA grafu ekstra djevičanska ulja su označena sa plavim kvadratićem, a mješavine s 1 % R su označene crvenim kružićem.

Slika 37. Usporedba izmjerenih referentnih vrijednosti i onih predviđenih iz NIR spektra za a) sadržaj slobodnih masnih kiselina, b) peroksidni broj, c) K_{232} vrijednost i d) K_{270} vrijednost kod 11 novih uzoraka maslinovog ulja.

Slika 38. Korelacija između sadržaja a) oleinske kiseline određene analizom GC-MS i apsorbancije ulja pri 1667,5 nm te b) linolne kiseline određene analizom GC-MS i apsorbancije ulja pri 1819 nm. Određene NIR regije mogu biti prediktori sadržaja oleinske i linolne kiseline u maslinovom ulju.

TABLICE

Tablica 1. Sistemski i trivijalni nazivi masnih kiselina, njihove kratice s naznačenim brojem ugljika koji čine masne kiseline te brojem dvostrukih veza.

Tablica 2. Glavna područja NIR za ulja i masti te području pripadajuće biomolekule.

Tablica 3. Opis uzoraka maslinovog ulja iz svih godina uzorkovanja

Tablica 4. Opis uzoraka za analizu krivotvorenja ekstra djevičanskog maslinovog ulja

Tablica 5. Masa uzorka koja se uzima za analizu s obzirom na očekivani peroksidni broj.

Tabla 6. Opća nomenklatura TAG dobivenih MALDI-MS analizom maslinovog ulja na temelju usporedbe eksperimentalno dobivenih i teorijski izračunatih m/z vrijednosti.

Tablica 7. Osnovni parametri kvalitete svih hrvatskih maslinovih ulja iz 2014.

Tablica 8. Sastav i udio masnih kiselina maslinovih ulja iz Hrvatske s godinom proizvodnje 2014.

Tablica 9. Sastav i udio triacilglicerola maslinovih ulja iz Hrvatske s godinom proizvodnje 2014.

Tablica 10. Osnovni parametri kvalitete svih ($n=60$) hrvatskih maslinovih ulja iz 2015. godine.

Tablica 11. Sastav i udio masnih kiselina i triacilglicerola ekstra djevičanskih ulja iz Hrvatske (n=41) s godinom proizvodnje 2015.

Tablica 12. Vrijednost Fischerovog koeficijenta i p-vrijednosti dobivene jednosmjernom analizom varijanci. ANOVA je pokazala da postoji povezanost između kategorije ulja i udjela pojedinih triacilglicerola, stoga je u daljnjem istraživanju korištena samo kategorija ekstra djevičanskih ulja.

Tablica 13. Statistički parametri dobiveni PLS-DA u kalibracijskom modelu koristeći različite grupe varijabli.

Tablica 14. Rezultati klasifikacije 11 novih EDMU uzoraka iz vanjskog validacijskog seta u modelima PLS-DA s NIR važnim varijablama ili TAG. Vrijednost 1 označava da uzorak pripada grupi, vrijednost 0 da ne pripada, a kao granična vrijednost uzeta je 0,5. U tablici su uspoređene za svaki uzorak njegove predviđene vrijednosti modelima i njihova referentna vrijednost.

Tablica 15. Rezultati klasifikacije 14 EDMU/DMU uzoraka iz 2014. na temelju kalibracijskog modela PLS-DA s važnim NIR varijablama ili TAG dobivenih analizom uzoraka iz 2015. godine. Vrijednost 1 označava da uzorak pripada grupi, vrijednost 0 da ne pripada, a kao granična vrijednost uzeta je 0,5. U tablici su uspoređene modelima predviđene vrijednosti i njihova referentna vrijednost za svaki uzorak .

Tablica 16. Rezultati klasifikacije 6 EDMU uzoraka iz 2013. na temelju kalibracijskog modela PLS-DA s važnim NIR varijablama ili TAG dobivenih analizom uzoraka iz 2015. godine. Vrijednost 1 označava da uzorak pripada grupi, vrijednost 0 da ne pripada, a kao granična vrijednost uzeta je 0,5. U tablici su uspoređene modelima predviđene vrijednosti i njihova referentna vrijednost za svaki uzorak .

Tablica 17. K-brojevi određeni za ekstra djevičansko maslinovo ulje Id23 i njegove krivotvorine (R1, R10, R20, S1, S10 i S20) te ulja koja su se koristila za simulaciju krivotvorenja (jestivo suncokretovo ulje S, maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja R).

Tablica 18. Vrste i udio pojedinog TAG određen uz pomoć MALDI-TOF/MS u uzorcima za ispitivanje krivotvorenja.

Tablica 19. Statistički parametri kalibracije i križne validacije u određivanju parametara kvalitete maslinovih ulja iz NIR spektra (n=49).

Tablica 20. Određivanje sadržaja TAG i masnih kiselina uz pomoć analize PLS u kojoj se koristio NIR spektar (n=41) u području od 1333 do 2222 nm.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNJE INFORMACIJE

Željka Peršurić

📍 Glagoljaša 10, 52466 Novigrad, Hrvatska

✉ zpersuric@biotech.uniri.hr

Spol Žensko | Datum rođenja 24.12.1987. | Državljanstvo Hrvatsko

RADNO ISKUSTVO

Veljača 2017.-danas
Veljača 2015.-Rujan 2016.

Asistent na Odjelu za biotehnologiju

Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka
Istraživanje, rad u laboratoriju, održavanje seminara i vježba, pisanje projekata

Djelatnost ili sektor Znanstveno-istraživačka institucija

Svibanj 2012.- Prosinac
2014.

Znanstveni novak u suradničkom zvanju i na radnom mjestu asistenta na projektu HRZZ-a "Visokoprotlačne analitičke platforme za kontrolu kvalitete i provjeru izvornosti hrane iz jadranskog područja"

Centar za mikro i nano znanosti i tehnologije, Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka

Istraživanje, rad u laboratoriju, održavanje seminara i vježba, pisanje projekata

Djelatnost ili sektor Znanstveno-istraživačka institucija

Veljača - Travanj 2012.

Nutricionist

EuroVita d.o.o., Vrtlišće, Pazin 52000

Priprema dokumentacije za Ministarstvo zdravlja, praćenje tržišta, razvijanje novih dodataka prehrani

Djelatnost ili sektor Prodaja i proizvodnja farmaceutskih proizvoda

Listopad- Prosinac 2011.

Praksa u prehrambenom inženjerstvu

Institut za prehrambeno inženjerstvo, Istraživački centar za mliječne proizvode i hranu Weiherstephan, Tehničko sveučilište u München – Freising, Njemačka

▪ Istraživanje i razvoj novog proizvoda

Djelatnost ili sektor Znanstveno-istraživačka institucija

OBRAZOVANJE

- Rujan 2013.- danas **Doktorski studij Medicinska kemija**
Sveučilište u Rijeci- Odjel za biotehnologiju, Institut "Ruđer Bošković" i Fidelta d.o.o, Rijeka, Zagreb
- 2009.-2011. **Diplomski studij nutricionizma; Magistar nutricionizma**
Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb
- Interdisciplinarna znanja iz nutricionizma i prehrambene tehnologije
 - Diplomski rad "Utjecaj kultivara i načina proizvodnje na fitosterole, skvalen i tokoferole repičinog ulja "
- 2006.-2009. **Preddiplomski studij nutricionizma; Sveučilišni prvostupnik nutricionizma**
Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb
- Znanje iz područja kemije, biokemije, biologije, toksikologije, znanosti o prehrani, kontroli kakvoće hrane i procesa pripreme hrane
 - Završni rad "Bioaktivni spojevi u ekstra djevičanskom maslinovom ulju"
- 2002.-2006 **Matura, Opća gimnazija**
Srednja škola Mate Balote, Poreč

OSOBNJE VJEŠTINE

Materinski jezik Hrvatski

Ostali jezici

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
Engleski	C1	C1	B2	B2	B2
Talijanski	C1	B2	B1	B1	B2
Njemački	B1	A2	A1	A1	A1

Stupnjevi: A1/2: Početnik - B1/2: Samostalni korisnik - C1/2 Iskusi korisnik
Zajednički europski referentni okvir za jezike

DODATNE INFORMACIJE

Publikacije

- Ž Peršurić, L Saftić, T Mašek, S Kraljević Pavelić (2018) Comparison of triacylglycerol analysis by MALDI-TOF/MS, fatty acid analysis by GC-MS and non-selective analysis by NIRS in combination with chemometrics for determination of extra virgin olive oil geographical origin. A case study, LWT, prihvaćen za tisak, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.072>.
- A-M Jergović, Ž Peršurić, L Saftić, Lara (2017) Evaluation of MALDI-TOF/MS

Technology in Olive Oil Adulteration. J Am Oil Chem Soc , 94 (6), str. 749-757.

- Ž Peršurić , J Osuga , T Galinac Grbac , J Peter-Katalinić , S Kraljević Pavelić (2017) MALDI-SpiralTOF technology for assessment of triacylglycerols in Croatian olive oils. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 119 (2), 1500375, DOI: 10.1002/ejlt.201500375
- D Josić, Ž Peršurić, D Rešetar, T Martinović, L Saftić, S Kraljević Pavelić (2016) Chapter Six- Use of foodomics for control of food processing and assessing of food safety. U: Advances in Food and Nutrition Research (F. Toldrá, ured.), 81, Academic Press , str. 187-229.
- D Josić, D Rešetar, Ž Peršurić, T Martinović, S Kraljević Pavelić (2017) Chapter 29-Detection of microbial toxins by -omics methods: a growing role of proteomics. U: From Paddock to Plate: Proteomics in Food Science (M.L. Colgrave, ured.), Elsevier, London, str. 485-506.

Sažeci u zbornicima skupova (poster)

- L Penić-Ivanko, I Šimunčić, Ž Peršurić, Doručak-najvažniji obrok u danu, 7.Hrvatski kongres debljine-Studentski simpozij, Opatija, Hrvatska, 2018.
- L Saftić, Ž Peršurić, T Pavlešić, S Kraljević Pavelić, Bogatstvo i raznolikost hrvatskog propolisa, 8. Nacionalna konferencija o sigurnosti i kakvoći pčelinjih proizvoda, Novi Vinodolski, 2018.
- L Saftić, Ž Peršurić, Secrets of mediterranean diet, ENDA 13th Nursing congress, Opatija, Hrvatska, 2017.
- Ž Peršurić, L Saftić, S Kraljević Pavelić, The potential of coupling NIRS with chemometrics for determination of extra virgin olive oil geographical origin, Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, Opatija, Hrvatska, 2017.
- Ž Peršurić, L Saftić, S Kraljević Pavelić, The potential of coupling high-throughput technologies to determine authenticity of Croatian extra virgin olive oil, 10. Ljetna škola masene spektrometrije, Dubrovnik, 2016 (poster).
- D Rešetar, Ž Peršurić, M Klobučar, J Peter-Katalinić, S Kraljević Pavelić, Mass spectrometry in the Centre for high-throughput technologies, 9. Ljetna škola masene spektrometrije, Dubrovnik, 2015.
- Ž Peršurić, J Osuga, T Galinac Grbac, J Peter-Katalinić, S Kraljević Pavelić, Analysis of triacylglycerols in olive oil as markers for geographical and vegetable oil certification by MALDI-TOF MS, 8. Ljetna škola masene spektrometrije, Dubrovnik, 2014.

Nastavna djelatnost

- Asistent na predmetu Bioeseji u istraživanju lijekova, Odjel za biotehnologiju, Rijeka, ak. g. 2014./2015., 2015./2016., 2016./2017., 2017./2018.
- Asistent na predmetu Bioaktivne komponente mediteranske prehrane, Odjel za biotehnologiju, Rijeka, ak. g. 2013./2014., 2014./2015., 2015./2016., 2016./2017., 2017./2018.
- Asistent na predmetu Sistemska biomedicina, Odjel za biotehnologiju, Rijeka, ak. g. 2013./2014., 2015./2016., 2016./2017., 2017./2018.
- Asistent na predmetu Kemijsko računanje u biotehnologiji , Odjel za biotehnologiju, Rijeka, ak. g. 2013./2014., 2014./2015., 2015./2016.
- Asistent na predmetu Instrumentalno-analitičke metode u biotehnologiji, Odjel za biotehnologiju, Rijeka, ak. g. 2014./2015.
- Asistent na predmetu Uvod u istraživački rad, Odjel za biotehnologiju, Rijeka, ak. g. 2015. /2016.

- Asistent na predmetu Personalizirana medicina, Odjel za biotehnologiju, Rijeka, ak. g. 2014. /2015.
- Asistent na predmetu OMICS metode u biotehnologiji, Odjel za biotehnologiju, ak. g. 2015. /2016., 2016./2017., 2017./2018.
- Asistent na predmetu Opća kemija, Odjel za biotehnologiju, Rijeka, ak. g. 2013. /2014.
- Suradnik na predmetu Tehnologija i kontrola kakvoće hrane II, Medicinski fakultet, Rijeka, ak.g. 2012./2013.

Cjeloživotno obrazovanje

- Kako napisati znanstveni rad na engleskom jeziku , Filozofski fakultet, Rijeka, 2016.
- Jezično usavršavanje nastavnika za engleski kao jezik visokoškolske nastave, Filozofski fakultet, Rijeka, 2015.

Priznanja i nagrade

- Dobitnica stipendije grada Novigrada tijekom preddiplomskog studija
- Dobitnica državne stipendije A kategorije za osobito nadarene studente tijekom diplomskog studija
- Dobitnica IAESTE stručne prakse 2011.